

LEVEDURAS DE COLMOS COMO PAN-MICROBIOTA ECO-
ADAPTATIVA DE CANA-DE-AÇÚCAR

LARINNE PAIVA VIÉGAS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO- UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
DEZEMBRO - 2019

LEVEDURAS DE COLMOS COMO PAN-MICROBIOTA ECO- ADAPTATIVA DE CANA-DE-AÇÚCAR

LARINNE PAIVA VIÉGAS

“Tese 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 Doutor em Produção Vegetal”

Orientador: Prof. Arnaldo Rocha Façanha

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
DEZEMBRO - 2019

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

V656	Viegas, Larinne Paiva. LEVEDURAS DE COLMOS COMO PAN-MICROBIOTA ECO-ADAPTATIVA DE CANA-DE-AÇÚCAR / Larinne Paiva Viegas. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2019. 204 f. : il. Inclui bibliografia. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2019. Orientador: Arnaldo Rocha Facanha. 1. Isolamento e Caracterização de Leveduras. 2. Leveduras Ácido-Resistentes. 3. Leveduras Alumínio-Resistentes. 4. Cana-de-açúcar. 5. Promoção de Crescimento Vegetal. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título. CDD - 630
------	--

LEVEDURAS DE COLMOS COMO PAN-MICROBIOTA ECO- ADAPTATIVA DE CANA-DE-AÇÚCAR

LARINNE PAIVA VIÉGAS

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuária, da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutorado em Produção Vegetal.”

Aprovada em 03 de dezembro de 2019

Comissão Examinadora:

Silvaldo Felipe da Silveira (D.Sc., Fitopatologia) – UENF/LEF

Solange Silva Samarão (D.Sc., Biociências e Biotecnologia) – UENF/LSA

Mirella Pupo Santos (D.Sc., Fisiologia e Biologia Molecular) – NUPEM/UFRJ

Anna Lvovna Okorokova-Façanha (DSc., Química Biológica) – UENF/LFBM

Arnoldo Rocha Façanha (DSc., Química Biológica) – UENF/LBCT
(Orientador)

“Coragem! Mais vale errar, se arrebentando, do que
poupar-se para nada.” (Darcy Ribeiro, 1922 - 1997)

AGRADECIMENTOS

A UENF pelo meu aprendizado durante toda minha trajetória acadêmica, da graduação ao doutorado;

A CAPES pela concessão da bolsa durante o período de pós-graduação;

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

Ao grupo “*yeast*” (Flávia, Keilla, Layz, Renam, Antônio, Ana Cristina e Lívia) que me coorientaram, desde a iniciação científica, me proporcionando um ambiente de trabalho familiar, me inspirando e motivando profissionalmente;

Aos membros técnicos do LFBM que foram o impulso para o andamento do meu trabalho;

Aos colegas do LFBM que estiveram presente comigo nessa trajetória em convivência e diálogo durante minha estadia no laboratório;

Aos meus familiares que me motivaram a continuar firme nessa caminhada com palavras motivadoras e conforto psicológico, em especial, minha irmã Larissa, minhas amigas Thaynã, Géssika, Flávia Camila e Maria Eliza, e meu namorado Carlos.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	ii
SUMÁRIO	iii
LISTA DE ESQUEMAS	v
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMO	x
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. Cana-de-açúcar	5
2.2. Micro-organismos promotores do crescimento vegetal (MPCV)	8
2.3. Efeito do pH no cultivo de plantas e de micro-organismos	11
2.4. Micro-organismos solubilizadores de fósforo (MSF)	25
2.5. Micro-organismos solubilizadores de zinco (MSZ).....	29
2.6. Micro-organismos produtores de compostos indólicos	31
3. OBJETIVOS.....	35
3.1. Objetivos específicos	35
4. MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1. Isolamento de leveduras da cana-de-açúcar	37
4.2. Identificação molecular das leveduras isoladas de cana-de-açúcar	40
4.3. Manutenção dos isolados	44

4.4. Análise da capacidade de solubilização de fosfato de cálcio e óxido de zinco	45
4.5. Análise da resistência das leveduras durante o crescimento em pH ácido e em meio contendo alumínio.....	46
4.6. Determinação da produção de compostos indólicos com especificidade para o ácido indol-3-acético.....	47
4.7. Análises estatísticas	48
5. RESULTADOS	49
5.1. Identificação das leveduras isoladas de colmo de cana-de-açúcar	49
5.2. Solubilização dos nutrientes fósforo e zinco	56
5.3. Análise da resistência das leveduras isoladas do colmo de cana-de-açúcar a diferentes pHs.....	58
5.4. Análise da resistência das leveduras isoladas do colmo de cana-de-açúcar a diferentes concentrações de alumínio	60
5.5. Determinação da produção de compostos indólicos com especificidade para o ácido indol-3-acético (AIA) pelas leveduras isoladas de colmo de cana-de-açúcar	64
6. DISCUSSÃO.....	67
7. RESUMO E CONCLUSÕES.....	92
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95
APÊNDICES	144
Apêndice A: Árvore Filogenética, gerada a partir do sequenciamento da região ITS (Internal Transcribed Spacer) das leveduras isoladas do colmo de cana-de-açúcar.....	145
Apêndice B: Sequências recuperadas no BLASTN/NCBI baseadas na análise BLASTn/NCBI da região ITS (<i>Internal Transcribed Spacer</i>).....	149
Apêndice C: Alinhamento múltiplo de sequências recuperadas no BLASTn/NCBI baseado na análise da região ITS (<i>Internal Transcribed Spacer</i>)	156
Apêndice D: Alinhamento múltiplo de sequências recuperadas no BLASTn/NCBI baseada na análise do domínio D1/D2 da subunidade maior do 28s/LSU (<i>large subunit</i>)	171

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Viagem da cana-de-açúcar. _____	6
Esquema 2. Interação entre planta e micro-organismos e seus benefícios para a promoção do crescimento vegetal. _____	10
Esquema 3. Compartimentalização do pH e gradientes de pH em <i>S. cerevisiae</i> cultivada com glicose. _____	23
Esquema 4. Diagrama representativo da dinâmica do fósforo do solo. ____	27
Esquema 5. Vias de biossíntese de Ácido Indol-3-Acético (AIA). _____	33
Esquema 6. Representação das regiões amplificadas para identificação das espécies de levedura. _____	43
Esquema 7. Representação do cálculo da eficiência de solubilização. _____	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Identificação das leveduras isoladas do colmo cana-de-açúcar <i>Saccharum</i> spp. com os marcadores moleculares da subunidade RNA ribossômico _____	52
Tabela 2. Eficiência de solubilização de fósforo e zinco pelas leveduras isoladas de colmo de cana-de-açúcar. _____	57
Tabela 3. Porcentagem de crescimento das leveduras isoladas do colmo de cana-de-açúcar quando cultivadas na presença de alumínio ($AlK(SO_4)_2$) _____	63
Apêndice A: Tabela 4. Espécies de leveduras depositadas no banco de dados para a região ITS _____	145
Apêndice B: Tabela 5. Sequências para a levedura SPC1 (<i>Candida</i> sp.) _	149
Apêndice B: Tabela 6. Sequências para as leveduras RBC2 e RBC3 (<i>Candida</i> sp.) _____	151
Apêndice B: Tabela 7. Sequências para as leveduras RBH1 e RBH2 (<i>Hanseniaspora</i> sp.) _____	151
Apêndice B: Tabela 8. Sequências para as leveduras CBM1, SPM2, SPM3 e SPM4 (<i>Meyerozyma</i> sp.) _____	152
Apêndice B: Tabela 9. Sequências para as leveduras CBM5, CBM7, SPM9 e SPM10 (<i>Meyerozyma</i> sp.) _____	153
Apêndice B: Tabela 10. Sequências para as leveduras CB6 e CBM8 (<i>Meyerozyma</i> sp.) _____	154
Apêndice B: Tabela 11. Sequências para as leveduras <i>Rhodotorula</i> sp. __	155

Apêndice C: Tabela 12. Grau de conservação dos nucleotídeos (sítios conservados) obtidos no alinhamento MUSCLE para as leveduras *Meyerozyma* sp. baseados na região ITS (Internal Transcribed Spacer) __ 170

Apêndice D: Tabela 13. Grau de conservação dos nucleotídeos (sítios conservados) obtidos no alinhamento MUSCLE para as leveduras *Meyerozyma* sp. baseados no domínio D1/D2 da subunidade maior do 28s/LSU (large subunit) _____ 183

Apêndice D: Tabela 14. Espécies de leveduras depositadas no banco de dados para domínio D1/D2 _____ 184

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. DNA genômico extraído das leveduras isoladas de cana-de-açúcar. _____	51
Figura 2. Crescimento in vitro das leveduras isoladas do colmo de cana-de-açúcar em diferentes condições de pH. _____	60
Figura 3. Resposta do crescimento das leveduras isoladas do colmo de cana-de-açúcar sob estresse do metal pesado alumínio. _____	62
Figura 4. Determinação da produção de compostos indólicos com especificidade para o ácido indol-3-acético (AIA). _____	66
Apêndice A: Figura 5. Árvore Filogenética das leveduras isoladas do colmo de cana-de-açúcar. _____	147
Apêndice C: Figura 9. Alinhamento MUSCLE para as leveduras <i>Candida</i> sp. _____	156
Apêndice: Figura 10. Alinhamento MUSCLE para as leveduras <i>Hanseniaspora</i> sp. com <i>Hanseniaspora vinea</i> . _____	160
Apêndice C: Figura 11. Alinhamento MUSCLE para as leveduras <i>Rhodotorula</i> sp. com <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> . _____	164
Apêndice D: Figura 12. Alinhamento MUSCLE do domíni D1/D2 – 28s/LSU para as leveduras <i>Candida</i> sp. _____	171
Apêndice D: Figura 13. Alinhamento MUSCLE do domíni D1/D2 – 28s/LSU para as leveduras <i>Hanseniaspora</i> sp. com <i>Hanseniaspora vinea</i> . _____	174

Apêndice D: Figura 14. Alinhamento MUSCLE do domíni D1/D2 – 28s/LSU para as leveduras *Rhodotorula* sp com *Rhodotorula mucilaginosa*. _____ 177

Apêndice D: Figura 15. Dendograma das leveduras isoladas do colmo de cana-de-açúcar a partir domínio D1/D2 da subunidade maior do 28s/LSU (large subunit). _____ 186

RESUMO

VIÉGAS, Larinne Paiva, D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Dezembro de 2019. LEVEDURAS DE COLMOS COMO PAN-MICROBIOTA ECO-ADAPTATIVA DE CANA-DE-AÇÚCAR. Orientador: Prof. Arnaldo Rocha Façanha. Coorientadora: Prof^a Anna L. Okorokova Façanha

Cana-de-açúcar é uma das principais culturas da agroindústria nacional, cujas espécies integram o gênero *Saccharum* da família das Poaceas, nativas do Sudeste asiático e Nova Guiné, e cujos híbridos interespecíficos têm sido desenvolvidos e amplamente cultivados nas regiões tropicais do globo. Espécies selvagens foram domesticadas ainda durante a pré-história, e micro-organismos endofíticos provavelmente acompanharam a disseminação da espécie para o Oriente Médio, África, Europa e posteriormente, para as Américas, podendo ter contribuído de forma determinante para o grande potencial adaptativo dos híbridos às intempéries tropicais, tais como o déficit hídrico, a baixa disponibilidade do fósforo, e a acidez dos solos. O presente trabalho teve como objetivo isolar, identificar e caracterizar leveduras associadas ao colmo da cana-de-açúcar, tecidos de propagação vegetal em cultivos, analisando indicadores fisiológicos, bioquímicos e moleculares do potencial destas leveduras como promotoras do crescimento vegetal. A capacidade de produção de compostos indólicos e de solubilização de fósforo e zinco foi determinada, bem como o crescimento em condições de pH ácido e presença de alumínio. Vinte isolados de leveduras foram identificados por meio do sequenciamento da região ITS (*Internal*

Transcribed Spacer) como pertencentes a quatro gêneros distintos: *Candida* sp. (3 leveduras), *Hanseniaspora* sp. (2 leveduras), *Meyerozyma* sp. (10 leveduras) e *Rhodotorula* sp. (5 leveduras). Os gêneros *Candida*, *Hanseniaspora* e *Meyerozyma* pertencem ao filo Ascomycota, enquanto que o gênero *Rhodotorula* ao filo Basidiomycota. Os resultados obtidos demonstram a capacidade dessas leveduras crescerem em condições ácidas, equivalentes as da maioria dos solos da faixa intertropical onde o cultivo da cana-de-açúcar floresceu, e indicam o respectivo potencial promotor do crescimento vegetal de cada cepa, via: (i) ação fitormonal por sintetizarem compostos indólicos, incluindo o ácido indol-3-acético (AIA) e (ii) disponibilização de nutrientes através da solubilização de fósforo e zinco. Os gêneros que mais se destacaram nas características descritas foram *Candida* e *Rhodotorula*. Os dados, em conjunto, corroboram a tese de que canas-de-açúcar cultivadas no Brasil mantêm interações com leveduras ancestrais, capazes de contribuir com múltiplos benefícios para a produção vegetal, dotadas de propriedades tais que podem refletir um papel adaptativo fundamental que tais fungos tenham exercido durante todo o processo de distribuição biogeográfica desta importante cultura ao longo de sua história.

ABSTRACT

VIÉGAS, Larinne Paiva, D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. December, 2019. Yeasts as eco-adaptive pan-microbiota of sugar cane stalks. Advisor: Professor Arnaldo Rocha Façanha. Co-advisor: Professor Anna L. Okorokova Façanha

Sugar cane is one of the main crops of the national agribusiness, which species are part of the genus *Saccharum* of the Poaceas family, native from Southeast Asia and New Guinea, and which interspecific hybrids have been developed and widely cultivated in the tropical regions of the globe. Wild species were domesticated during prehistory, and it is likely that endophytic microorganisms accompanied the spread of the species to the Middle East, Africa, Europe and later to the Americas, and contributed decisively to the great adaptive potential of hybrids to tropical weather, such as water deficit, low phosphate availability and soil acidity. The present work aimed to isolate, identify and characterize yeasts associated with the sugar cane stalk, tissue region used for micro-propagation, analyzing physiological, biochemical and molecular indicators of the potential of these yeasts as promoters of plant growth. The production capacity of indolic compounds and phosphorus and zinc solubilization were determined, as well as the growth under acid pH and aluminum stress. Twenty yeast isolates were identified by sequencing the Internal Transcribed Spacer (ITS) region as belonging to the four distinct genus: *Candida* sp. (3 yeasts), *Hanseniaspora* sp. (2 yeasts), *Meyerozyma* sp. (10 yeasts) and *Rhodotorula* sp. (5 yeasts). The genus *Candida*,

Hanseniaspora and *Meyerozyma* belonging to phylum Ascomycota, while the genus *Rhodotorula* to phylum Basidiomycota. The results suggest the ability of these yeasts to grow under acidic conditions, equivalent to those of sugar cane cultivation, presenting potential plant growth promotion via: (i) phytohormonal action by synthesizing indole compounds, including indole-3-acetic acid (IAA) and (ii) nutrient availability through phosphorus and zinc solubilization. The genders that most stood out in the described characteristics were *Candida* and *Rhodotorula*. The data, together, corroborate the thesis that sugar cane grown in Brazil carry ancestral yeasts, capable of contributing to multiple benefits to plant production, with properties that may reflect a fundamental adaptive role that these fungi have exercised throughout the process of biogeographic distribution of this important culture throughout history.

1. INTRODUÇÃO

A real diversidade de espécies existentes de fungos é difícil de ser estimada. O clássico Dicionário dos Fungos, em sua 10ª edição, traz um número de 98.128 espécies, sendo a maioria espécies de ascomicetos terrestres e basidiomicetos (Kirk et al., 2008). Especificamente, no cenário nacional, o Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil descreve um total de 5.719 espécies de fungos distribuídos em 1.246 gêneros, sendo que a Mata Atlântica compreende o maior número de registros, 3.017 espécies (Forzza et al., 2010).

Hawksworth e Lücking (2017) estimaram a existência de 2,2 a 3,8 milhões de espécies de fungos que extrapola os números de fungos secos (cerca de 1,25 milhão de espécimes) da maior coleção e uma das mais antigas e cientificamente importantes do mundo, *Fungarium* no *Kew Royal Botanic Gardens*. Essa coleção incluindo espécimes de mais de 240 países de todos os continentes (Kew, 2019). Tal discrepância numérica entre as estimativas globais e o que já fora catalogado e armazenado, por um lado, espelha a dificuldade de manter muitas espécies de fungos em condições adversas e/ou pelo menos diversas a dos ambientes de origem, por outro, assevera a necessidade de um maior foco neste campo estratégico do saber. O acúmulo de dados de sequência de DNA tem proporcionado o aumento progressivo das estimativas da diversidade desses micro-organismos, sem exigir um prévio cultivo laboratorial, revolucionando a visão da diversidade microbiana (Lundberg et al., 2013; O'Brien et al., 2005).

Os fungos estão profundamente envolvidos na história evolutiva e na ecologia de todas as formas de vida da Terra (Peay et al., 2016). Estudá-los é simplesmente fundamental devido ao vastíssimo papel que exercem nas interações com plantas, animais e com outros micro-organismos. E, isto obviamente inclui os sistemas agroindustriais, para os quais abundante literatura tem demonstrado ser crucial entender a ecologia dessas interações que envolvem o estabelecimento da microbiota em cada cultura agrícola, a fim de prever melhor a estabilidade das comunidades microbianas naturais ou sintéticas para, então, definir melhor a dinâmica e o estabelecimento da comunidade microbiana no tempo e no espaço (Schlaeppli e Bulgarelli, 2015; Hassani et al., 2018).

Diversos estudos têm isolado micro-organismos da filosfera, rizosfera, endosfera de folhas ou raízes revelando uma série de características microbianas benéficas para planta hospedeira (Lugtenberg e Kamilova, 2009; Porras-Alfaro e Bayman, 2011; Vorholt, 2012). Tais micro-organismos em associação com a planta podem ser capazes de promover o crescimento da planta diretamente (exemplo, através da aquisição de minerais do solo) ou indiretamente (exemplo, através da proteção contra patógenos), e, por isso são denominados micro-organismos promotores do crescimento de vegetal (MPCV) (Syed e Tollamadugu, 2019; Banerjee et al., 2017), um nome genérico que abrange tanto bactérias quanto fungos (Amprayn et al., 2012; Finkel et al., 2017). Têm sido amplamente estudadas algumas características mais prevalentes em micro-organismos MPCV, incluindo a capacidade de: sintetizar o hormônio auxina responsável pelo desenvolvimento vegetal, incluindo o ácido indol-3-acético (AIA) (Spaepen e Vanderleyden, 2011, Xin et al., 2009; Liu et al., 2016); produzir sideróforos (Gray e Smith, 2005, Sharma et al., 2014); produzir substâncias com atividade antimicrobiana e inseticida (Aly, et al., 2010, El-Tarabily e Sivasithamparam, 2006; Sansone, et al., 2005).

Muitas leveduras – formas unicelulares ou não-miceliais de fungos – possuem diversas das características descritas acima (Limtong et al., 2014; Nutaratat et al., 2014). Por exemplo, foi demonstrado que as leveduras *Candida glabrata*, *C. maltosa* e *Rhodotorula rubra* reduziram a incidência da doença causada pelo fungo *Cephalosporium maydis*, patógeno de milho (El-Mehalawy et al., 2004), ou seja, são leveduras com capacidade antimicrobiana. Alonso et al., (2008) isolaram leveduras (pertencentes ao gênero *Rhodotorula* ou

Rhodosporidium e ao gênero *Cryptococcus*) com capacidade de solubilizar fosfato não solúvel e de estimular a colonização micorrízica em raízes de plantas.

Neste trabalho, se explorou o potencial de leveduras residentes em colmos de diferentes variedades de cana-de-açúcar para estabelecer interações mutualistas ancestrais, nas quais essa microbiota poderia ter contribuído para a adaptação e acompanhado a cana-de-açúcar ao longo de sua distribuição biogeográfica na zona tropical do planeta, nos mais diversos ambientes de crescimento em que tem sido cultivada. As variedades de cana-de-açúcar englobam:

Hipoteticamente, foi teorizado que culturas de cana-de-açúcar cultivadas em solos ácidos deveriam ter leveduras ancestrais associadas resistentes à acidez da solução intersticial e à toxicidade do alumínio (principais fatores inibitórios do crescimento vegetal em solos ácidos). Tais leveduras forneceria benefícios para uma melhor adaptação do vegetal a tais condições adversas, proporcionando o estabelecimento da planta em cada novo ambiente durante o processo de distribuição biogeográfica. Por exemplo, este parece ter sido o caso da levedura *Rhodotorula mucilaginosa*, isolada de um habitat rizosférico de solo ácidos por Silambarasan e colaboradores (2019). Ela tolera concentrações de 8 mM de alumínio e o acumula intracelularmente, solubiliza fosfato e produz AIA e sideróforos, qualificando-se como um bio-inoculante adequado para sistemas de cultivo em solos ácidos acometidos pela toxicidade de alumínio.

Neste estudo foram descritas características bioquímicas e fisiológicas, correlacionadas à promoção do crescimento vegetal, de leveduras isoladas do colmo de cana-de-açúcar da região de Campos dos Goytacazes, a fim de contribuir para o conhecimento da diversidade de leveduras associadas a essa cultura e elucidar como essas associações estabelecidas no decorrer da história poderiam ter auxiliado no estabelecimento da cana-de-açúcar em solos da faixa intertropical. Este trabalho inclui o isolamento, seleção e caracterização de espécies com capacidade de produzir compostos indólicos, tolerará condições de cultivo em meio ácido e com elevadas concentrações de alumínio, e/ou capazes de contribuir para a solubilização de fósforo e zinco, caracterização esta que deve não só prover conhecimentos básicos sobre interações ancestrais de impacto ecofisiológico na cultura da cana-de-açúcar, mas também constituir informações

úteis para o desenvolvimento futuro de inóculos capazes de potencializar as interações microbiotas ancestrais em benefício do desenvolvimento vegetal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

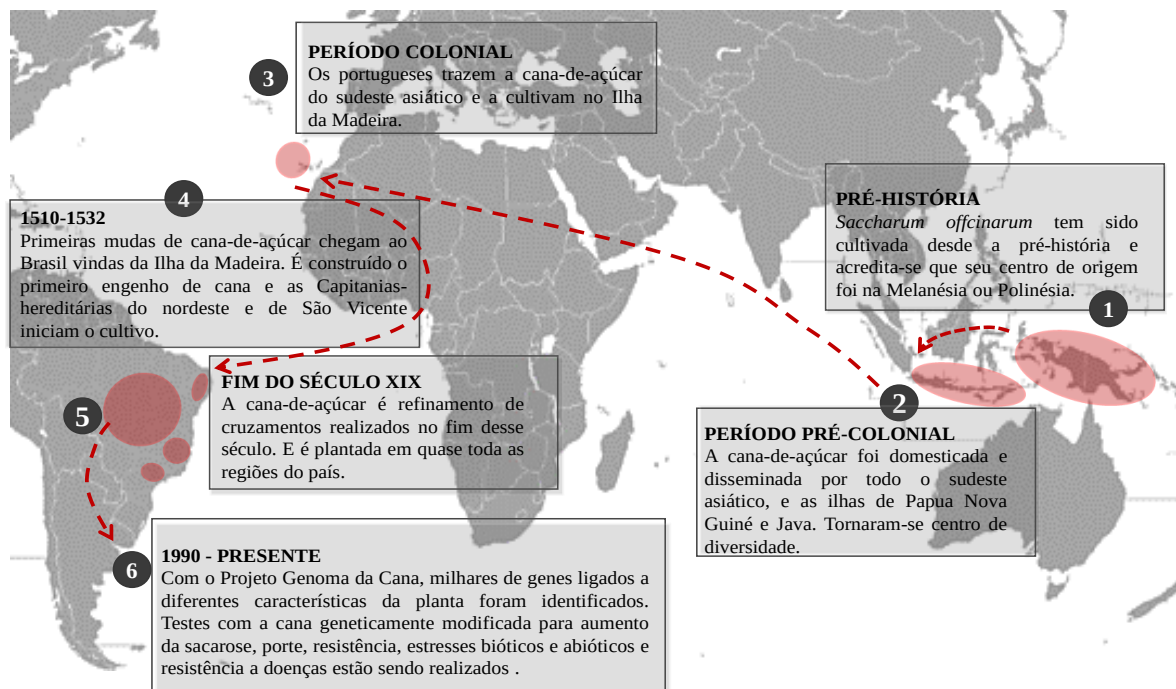
2.1. Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma espécie herbácea, pertencente à divisão *Embryophyta siphonogama*, ao filo *Magnoliophyta*, à classe *Liliopsida*, à ordem *Poales*, à família *Poaceae*, à tribo *Andropogoneae*, ao gênero *Saccharum*. O gênero *Saccharum* é representado por diversas espécies: *S. arundinaceum*, *S. baldwinii*, *S. brevibarbe*, *S. fulvum*, *S. giganteum*, *S. officinarum*, *S. barberi*, *S. edule*, *S. sinense*, *S. ravennae*, *S. robustum* e *S. spontaneum* (NCBI, 2019).

A cana-de-açúcar tem sido cultivada em vários países de climas tropicais e é bem adaptada à essa zona climática. As projeções para 2019 estimam que os canaviais ocupem cerca de 28 milhões de hectares, totalizando uma produção mundial de aproximadamente 2 milhões de toneladas, distribuídos nos principais países produtores, incluindo Índia, Estados Unidos da América, Tailândia, China e Brasil, dentre outros (OECD-FAO, 2018). Essa cultura tem sido a principal fonte vegetal de açúcar por vários milênios. Atualmente, somadas à produção do Brasil, China e Índia, corresponde a dois terços da produção mundial de cana-de-açúcar.

Barber (1920 e 1822) e Daniels e Daniels (1993) consideraram que a origem da cana-de-açúcar, espécie *S. officinarum*, é proveniente do Arquipélago Malaio, da Nova Guiné ou de alguns dos grupos de ilhas da Malanésia ou Polinésia. Enquanto o trabalho de Daniels e Roach (1987) descreve que as espécies de *S. officinarum* foram cultivadas, inicialmente, no sudeste da Ásia e

nas ilhas do Pacífico no período de 1500 e 1000 a.C., antes de se espalharem pelos trópicos. A cana-de-açúcar da China (*S.sinense*) e do norte da Índia (*S.barberi*) originaram cruzamentos híbridos naturais com *S. officinarum*. Clones de *S. barberi* ou híbridos entre *S. officinarum* e *S. barberi* foram levados da Índia através da Pérsia no século VI, chegando ao Mediterrâneo e à Espanha no século VIII. Os portugueses levaram a cana-de-açúcar para a Ilha da Madeira no século XV, de onde se espalhou para outras ilhas e para a África Ocidental. E chegou às Américas em 1493 quando, Cristóvão Colombo, genro de um grande produtor de açúcar da Ilha da Madeira, introduziu o plantio, em sua segunda viagem ao continente, onde hoje se localiza a República Dominicana.



Esquema 1. Viagem da cana-de-açúcar. O primeiro contato com a cana-de-açúcar foi na Nova Guiné. Essa planta foi observada por alguns generais de Alexandre, o Grande, em 327 a.C e mais tarde, no século XI, durante as Cruzadas. Os árabes introduziram seu cultivo no Egito no século X e pelo Mar Mediterrâneo, em Chipre, na Sicília e na Espanha. Em 1530, as primeiras mudas de cana-de-açúcar foram trazidas da Ilha da Madeira, na expedição colonizadora de Martim Afonso de Sousa quem iniciou o primeiro engenho na capitania São Vicente, em 1533. Logo se percebeu o sucesso do cultivo, a boa adaptação da planta ao ambiente brasileiro e a cana-de-açúcar se espalhou pelo litoral brasileiro. O pioneirismo coube ao Nordeste, principalmente as regiões de Pernambuco e Bahia onde os engenhos se espalharam e obtiveram grande crescimento econômico. Para história econômica brasileira, a cana-de-açúcar representa o segundo ciclo econômico de grande importância, dirigindo os rumos da economia brasileira e portuguesa durante os séculos XVI a XVIII. Também quanto à colonização, esse cultivo foi extremamente importante, uma vez que estimulou o povoamento da colônia e a ocupação de seu vasto litoral. Em 1999, foi criado o Projeto Genoma Cana com esforço, ainda em curso, de aprofundar o conhecimento sobre o metabolismo da cana, de modo a obter mais rapidamente variedades mais produtivas e resistentes à seca ou a solos pobres.

No Brasil, essa planta desembarcou das caravelas portuguesas, no início do século XVI e desde então, a cultura da cana-de-açúcar se estabeleceu tão bem nos solos brasileiros que veio a assumir posições de liderança mundial, principalmente nos últimos cinquenta anos, após grande aporte tecnológico provido pela EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) dentre outros centros de pesquisa.

Talvez o programa mais importante de melhoramento genético da cana-de-açúcar no Brasil tenha sido o programa conduzido por Frederico de Menezes Veiga, considerado na época o “Pai da Cana-de-açúcar do Brasil”, na Estação Experimental de Campos, em Campos dos Goytacazes, RJ, de 1946 a 1972. As variedades CB foram cultivadas em todos os recantos de nossa Pátria. Atualmente, existem no país quatro programas de melhoramento genético da cana-de-açúcar: Rede Interuniversitária de Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro – Ridesa (parte do antigo Planalsucar – variedades RB), Centro de Tecnologia Canavieira – CTC (antigo Centro de Tecnologia Copersucar – variedades SP), Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) e CanaVialis (fundada em 2004, trabalha em conjunto com a Allelyx, empresa dedicada ao desenvolvimento de variedades transgênicas não comerciais) (Nova Cana, 2020).

Conforme o 4º levantamento da safra de cana-de-açúcar 2018/2019, divulgado pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2019), a produção total de cana dessa temporada foi de 620,4 milhões de toneladas, representando uma redução de 2% em relação a 2017/18, que terminou em 633,26 milhões de toneladas. Embora nos últimos anos tenha experimentado um declínio, o Brasil continua sendo o maior produtor de açúcar, e as estimativas indicam que continuará sendo o principal produtor pelo menos até 2027, produzindo 34% da cana-de-açúcar do mundo (OECD-FAO, 2018). Tais valores são importantes pois, no Brasil, a cultura da cana-de-açúcar destinada à produção de etanol e a cogeração de eletricidade são a segunda fonte mais importante de energia (EPE, 2017). Só na região Centro-Sul, o volume total de etanol comercializado pelas usinas e destilarias somou 1,32 bilhão de litros na primeira quinzena de fevereiro do ano de 2019 (ÚNICA, 2019). Por isso, inúmeros estudos têm discutido os benefícios do setor sucroalcooleiro e sua consolidação no Brasil (Nassar et al., 2008; La Rovere et al., 2011), relatando que, em geral, essa expansão se deve principalmente pelo etanol ser uma fonte energética capaz de

reduzir o consumo de combustíveis fósseis e consequentemente atenuar os efeitos da emissão dos gases de efeito estufa (Goldemberg, 2007).

Na cana-de-açúcar, trabalhos abordando a comunidade microbiana, suas interações ecológicas como um todo e seus benefícios para o cultivo, ainda são escassos. Parte desta diversidade já foi descrita em comunidades associadas à parte aérea das plantas como endofíticos (Mendes et al., 2007; Magnani et al., 2010; Stuart et al., 2010), em associação com as raízes, como organismos rizosféricos (Luvizotto et al., 2010; Rossetto, 2008) e no solo com cultivo de cana-de-açúcar (Gumiere, 2012). Também as associações que os micro-organismos realizam com a cana-de-açúcar em diferentes tecidos da planta foram abordadas no estudo de Souza e colaboradores (2016), que verificaram a alteração da estrutura das comunidades de micro-organismos em relação aos diferentes compartimentos da planta, tanto os endofíticos, quanto os exofíticos (ver esquema 1A). A caracterização de micro-organismos simbióticos e/ou residentes da cana-de-açúcar, em especial das menos exploradas na maioria dos estudos, como é o caso das leveduras, pode elucidar como essa cultura foi se estabelecendo no decorrer da história e de que maneira esses micro-organismos poderiam ter auxiliado no estabelecimento dessa cultura em ambientes intertropicais, podendo tal informação ser estratégica para o desenvolvimento de novos inóculos e manejos que potencializem a abundância e/ou a eficiência destas interações ancestrais, agora em benefício da produtividade dos híbridos interespecíficos atuais.

2.2. Micro-organismos promotores do crescimento vegetal (MPCV)

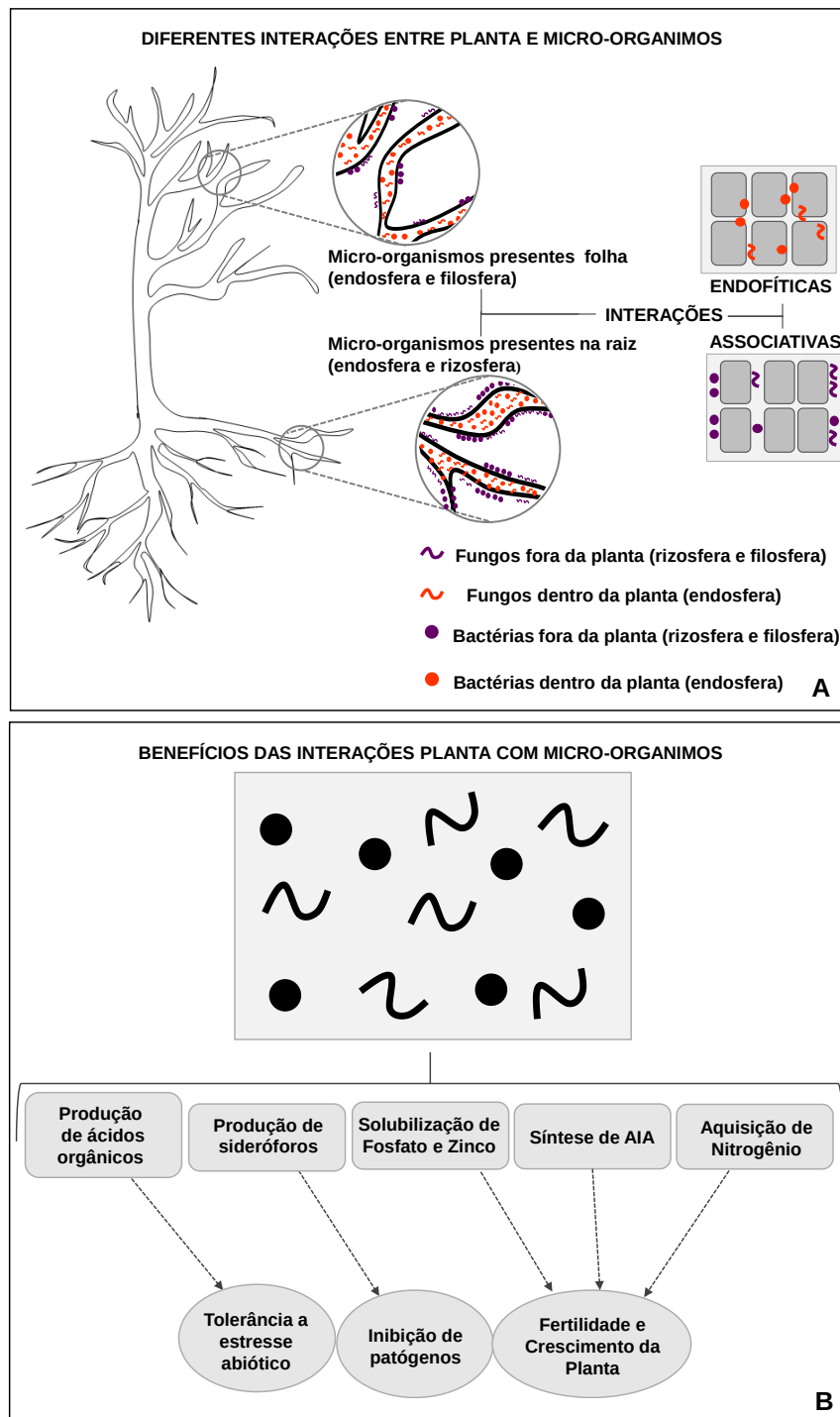
A agricultura é um setor com participação econômica significativa no país. A produtividade agrícola é afetada pelo decréscimo de terras aráveis, de água e de nutrientes (Berg, 2009), sendo assim o uso de fertilizantes e defensivos químicos, e práticas de melhoramento genético são estabelecidos com o propósito de manter a produtividade agroindustrial correspondentes à necessidade do consumo populacional (Barrow et al., 2008). Todavia, essas práticas vão contrarrente a um sistema agrícola sustentável que busca reduzir insumos que geram prejuízos ecológicos (Schäfer e Adams, 2014; Adesemoye et al., 2017).

Os micro-organismos promotores do crescimento vegetal são uma alternativa sustentável para o aumento da produtividade agrícola. Naturalmente, as plantas são colonizadas por uma grande diversidade de micro-organismos, a chamada microbiota vegetal (Kroll et al., 2017 – ver esquema 2A). A microbiota quando associada a rizosfera, folhas, flores e frutas, executa uma série de funções que podem afetar positivamente o crescimento e o rendimento das plantas hospedeiras (da Silva, et al., 2018).

Dentre as associações simbióticas mais estudadas figuram as estabelecidas entre plantas com rizobactérias (El-Tarabily e Sivasithamparam, 2006) e fungos micorrízicos (Schübler, et al., 2001; Smith e Smith, 2011) são exaustivamente estudados, pois contribuem para fixação de nitrogênio e o fornecimento de nutrientes para as plantas (particularmente fósforo, nitrogênio e zinco), respectivamente.

Os fungos são organismos que podem ser unicelulares, representados por leveduras, ou filamentosos, que consistem em hifas que se ramificam, e em conjuntos que compõem o micélio (Moreira, Siqueira, 2006). As leveduras e fungos leveduriformes estão distribuídos nos dois grandes grupos de fungos *Dikaria*: os ascomicetos e os basideomicetos (Kurtzman e Fell, 2006).

Cada vez mais, os benefícios das interações de plantas com micro-organismos são esclarecidos (ver esquema 2B) e conseqüentemente o uso de micro-organismos como inoculantes na agricultura aumentou nas últimas duas décadas (Hayat, et al., 2010; Berg, 2009; Bashan, et al., 2014). As leveduras são conhecidas por serem promotoras do crescimento vegetal, a exemplificar os gêneros: *Candida* (Amprayn et. al 2012), *Rhodotorula* (Khan et al., 2012), *Williopsis* (Nassar et al., 2005) e *Yarrowia* (Medina et al., 2004). Podendo ser aplicadas na agricultura como biofertilizantes, biopesticidas e em processos de fitorremediação (Kloepper, 1992; Vessey, 2003) e atuando como agentes de controle biológico ou agente bioestimulante (Bashan et al., 2014; du Jardin, 2015; Nally et al., 2013).



Esquema 2. Interação entre planta e micro-organismos e seus benefícios para a promoção do crescimento vegetal. (A) As interações microbianas com as plantas podem ser do tipo endofíticas quando os micro-organismos são capazes de viver no interior dos tecidos vegetais, sem causar nenhum dano ou do tipo associativas quando os micro-organismos vivem em contato íntimo com a superfície dos tecidos vegetais (filosfera e rizosfera, por exemplo). (B) A interação dos micro-organismos com as plantas pode beneficiá-las por diversos mecanismos: (i) tolerância ao estresse abiótico, por exemplo a produção de compostos orgânicos que alivia a toxicidade a metais pesados como o alumínio; (ii) defesa contra patógenos pela presença de características competitivas como a produção de sideróforos; (iii) aumento da fertilidade e crescimento das plantas através de fixação de nitrogênio, produção de AIA (ácido indol-3-acético) e solubilização de fósforo e zinco ao redor das raízes. (Adaptado de Weyenset al., 2015 e de Souza et al., 2015).

O uso de leveduras possui vantagens que incluem a capacidade de se multiplicar rapidamente, a adaptação às condições de cultivo (tempo, pH, nutrientes, temperatura, aeração) que podem ser modificadas com a finalidade de aumentar ou de direcionar a produção de metabólitos bioativos de interesse (El-Tarabily e Sivasithamparam, 2006). São distribuídas geograficamente em diversos habitats como caule (Vieira et al., 2012), folhas (Limtong et al., 2015), frutos (de Carvalho Neto et al., 2017) e águas (Butinar et al., 2005). Em solos, são encontradas em diferentes regiões geográficas e sob diferentes condições climáticas e composições químicas, umidade e pH (El-Tarabily e Sivasithamparam, 2006; Do Carmo Sousa, 1969; Alexander, 1977). Particularmente, as leveduras são numerosas nas raízes de certas plantas, como repolho, milho, beterraba sacarina e aveia (Bab'eva e Belyanin 1966; Alexander, 1977; Phaff et al., 1978).

Neste contexto, pressupõe-se que interações simbióticas estabelecidas no decorrer da co-evolução entre plantas (como a cana-de-açúcar) com leveduras auxiliariam na aptidão do cultivo vegetal e no crescimento da planta (de Souza et al., 2015). A aplicação biotecnológica dos micro-organismos na agricultura é muito atraente, pois leva a redução de insumos químicos sem afetar a produtividade (Berg, 2009; Trabelsi e Mhamdi, 2013; Mukherjee e Sen, 2015).

2.3. Efeito do pH no cultivo de plantas e de micro-organismos

A Terra proporciona um habitat diverso com condições físicas (por exemplo, temperatura, radiação, extremos de pressão) e geoquímicas (dessecação, salinidade, pH, espécies de oxigênio e ambientes potenciais redox) nas quais vários organismos se adaptaram para sobreviver e prosperar (Rothschild e Mancinelli, 2001).

O pH, potencial de hidrogênio, é uma escala que mede o grau de acidez ou alcalinidade de uma substância, podendo variar de 0 a 14. Quanto menor o pH de uma substância, maior a concentração de íons H^+ e menor a concentração de íons OH^- . As substâncias que possuem valores de pH 0 a 7, são consideradas ácidas, valores em torno de 7 são neutras e valores acima de 7 são denominadas básicas ou alcalinas. O pH de uma substância pode variar de acordo com sua

composição, concentração de sais, metais, ácidos, bases e substâncias orgânicas e da temperatura.

Os organismos acidófilos são os que preferem viver em condições ácidas denominados de acidófilo. O organismo mais acidófilo conhecido é a arquea *Picrophilus*, que chega a viver a pH 0,06, porém vários eucariotos unicelulares vivem abaixo do pH 1,0 (Rothschild e Mancinelli, 2001), como os três fungos, *Acontium cylatium*, *Cephalosporium sp.* e *Trichosporon cerebriae* que foram capazes de crescer perto do pH 0 (Schleper et al., 1995). Não foram encontradas plantas abaixo do pH 2,0 - 3,0. Os acidófilos requerem uma homeostase do pH intracelular da mesma forma que os neutralófitos (organismos que crescem mais adequadamente a um pH de 6,0 a 8,0), no entanto, acidófilos toleram gradientes de pH de várias ordens de magnitude maiores que neutralófitos (Baker-Austin e Dopson, 2007).

O ambiente alcalino é um ambiente igualmente desafiador, assim como o pH baixo. Denomina-se alcalófilos os organismos capazes de crescer nesse ambiente, até próximo a 14,0 (Horikoshi, 2016; Kevbrin, 2019). Nesses organismos, geralmente há uma diferença de duas ou mais unidades de pH entre o ambiente interno e externo da célula. Os prótons são escassos, criando obstáculos energéticos em micro-organismos que possuem ATP-sintase ligada à membrana como os procariontes aeróbicos (Krulwich et al., 1998). Representantes de todos os domínios e reinos de eucariotos são capazes de tolerar pH tão alto quanto aproximadamente 11,0 (Fig. 4; Javor et al., 1998). Os fungos alcalófilos mais conhecidos pertencem à divisão Ascomycota: *Acremonium alcalophilum* (Okada et al., 1993), *Gliocladium cibotii*, *Phialophora geniculata*, *Stachylidium bicolor* e *Stilbella annulata* (Nagai et al., 1995), *Acremonium sp.* e *Chrysosporium sp.* (Nagai et al., 1998), *Emericellopsis minima*, *Neosartorya stramenia* e *Melanospora zamiae* (isolados de diferentes tipos de solo na Argentina) (Lisichkina et al., 1993), *Sodiomyces* (isolados de solos alcalinos da Rússia, Mongólia, Quênia, Tanzânia); e *Thielavia sp.* (isolado de solos alcalinos da Rússia e Armênia) (Grum-Grzhimaylo et al., 2016).

2.3.1. Solos ácidos e a fitotoxicidade do alumínio (Al)

A qualidade do solo é a base para o desenvolvimento sustentável agrícola. Em 1994, Dorane Parkin propôs um conceito de qualidade do solo, agronomicamente ainda bastante utilizado: "Qualidade do solo é a capacidade de um solo funcionar dentro dos limites de um ecossistema natural ou manejado, para sustentar a produtividade de plantas e animais, manter ou aumentar a qualidade do ar e da água e promover a saúde das plantas, dos animais e dos homens". Em termos mais ecológicos, a qualidade do solo pode também ser definida como a capacidade do solo exercer suas funções na natureza que são: funcionar como meio para o crescimento das plantas; regular e compartimentalizar o fluxo de água no ambiente; estocar e promover a ciclagem de elementos na biosfera; servir como tampão ambiental na formação, atenuação e degradação de compostos prejudiciais ao ambiente (Larson e Pierce, 1994, Karlen et al., 1997).

O solo é um ecossistema complexo, abrigando uma microbiota composta por bactérias, fungos, protistas e animais (Bonkowski, et al., 2009; Muller, et al., 2016). Os micro-organismos presentes no solo representam uma fração considerável da biomassa viva na Terra (Whitman, et al., 1998), contendo de 10^3 a 10^4 kg de biomassa microbiana por hectare de solos (Brady e Weil, 2002). Esta microbiota desempenha papéis fundamentais no desenvolvimento e produtividade das plantas por meio de mecanismos diretos e indiretos, especialmente participando em associações simbióticas (Turner, James, Poole, 2013; Lugtenberg, Leveau, 2007). Especificamente, as populações de leveduras são mais numerosas nas camadas superiores dos solos, na faixa de aproximadamente 2 a 10 cm de profundidade, podendo variar de menos de 10 até 10^6 células cultiváveis por grama de solo (Do Carmo-Sousa, 1969; Phaffe Starmer, 1987). Os gêneros de levedura mais frequentemente, isolados dos solos incluem espécies dos gêneros: *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Lipomyces*, *Pichia*, *Aureobasidium*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Schizoblastosporion*, *Sporobolomyces*, *Torulaspora*, *Torulopsis*, *Trichosporon*, *Kluyveromyces*, e *Zygosaccharomyces* (Alexander, 1977; Spencer e Spencer, 1997).

A rizosfera é um ambiente edáfico que sofre influência do sistema radicular e com intensa colonização e atividade da microbiota constituída por diferentes grupos de micro-organismos (Turner et al., 2013; Bakker et al., 2013). A riqueza e estrutura da comunidade rizosférica é fortemente influenciada por compostos orgânicos exsudados pelas raízes, pois são fontes nutricionais para os micro-organismos crescerem, em contrapartida os micro-organismos retornam inúmeros benefícios às plantas. Em cada grama de solo rizosférico, há cerca de 10^{11} células de micro-organismo e 10^{12} genes funcionais, ou seja é um ambiente com alta densidade microbiana (Bertinet al., 2003; Egamberdieva et al., 2008; Dennis et al., 2010; Trevors, 2010; Lundberg et al., 2012).

As plantas hospedam uma microbiota específica capaz de adaptar alterações de temperatura, pH, disponibilidade de oxigênio, conteúdo de nitrogênio, fósforo, umidade e tipo de solo (Brimecombe et al., 2007; Köberl et al., 2013; Chaparro et al., 2012). No entanto, é provável que as espécies vegetais sejam o determinante mais importante para a distinção da comunidade microbiana presente na rizosfera (Philippot et al., 2013). Em solos, a diversidade microbiota é maior em condições tropicais (Michereffet al., 2005). Nesses solos – tropicais e subtropicais úmidos – com altas precipitações pluviométricas, nutrientes solúveis como cálcio, magnésio, potássio e outros elementos básicos são lixiviados. Quando a remoção de cátions básicos é maior que sua taxa de liberação pelas intempéries, o pH do solo diminui (Echart e Cavalli-Molina, 2001; Lopes et al, 1991; Bohnet al., 1985). O pH dos solos é um dos fatores de maior influência à comunidade microbiana. O pH do solo pode controlar fatores bióticos, como a composição de biomassa de fungos e bactérias (Fierer e Jackson, 2006; Bââth et al., 2002; Rousk et al., 2009). Além de interferir fortemente em fatores abióticos, como disponibilidade de nutrientes (Kemmitt et al 2006) e solubilidade dos metais (Schmitt et al., 2016).

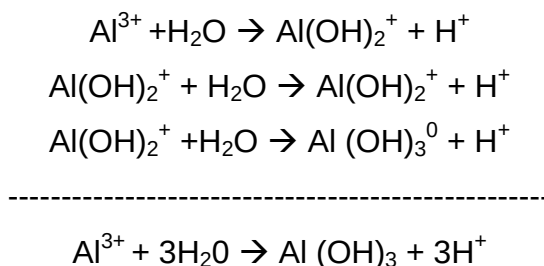
A ação do pH sobre os micro-organismos dependerá da sua capacidade de tolerância. A maioria dos micro-organismos apresenta uma faixa bastante estreita de pH ótimo, que deve ser determinada empiricamente para cada espécie. A maioria dos micro-organismos é neutrofíta (pH entre 6,0 e 8,0), embora alguns sejam acidófilos (pH ótimo ácido) e outros alcalófilos (pH ótimo alcalino) (Jawetz, Melnick e Adelberg, 2017). Ambos os micro-organismos regulam o pH interno dentro de uma ampla faixa de valores de pH ambiente. Os

acidófilos mantêm pH interno de cerca de 6,4 com relação à faixa de pH externa de 1,0 a 5,0. Os neutrófilos mantêm o pH interno de cerca de 7,5 em uma faixa de pH externa de 5,5 a 8,5. Os alcalófilos mantêm o pH interno de cerca de 9,5 em uma de pH externa de 9,0 a 11,0. Embora os fungos possam ser encontrados em solos com pH variando de 3,0 a 9,0, eles predominam em solos ácidos onde sofrem menor competição com as bactérias que são favorecidas normalmente por valores de pH neutro a alcalino. Em geral, colônias de leveduras são mais encontradas nas rizosferas (microambientes essencialmente ácidos) do que em regiões dos solos distantes dos sistemas radiculares (Cloete, et al., 2009). A análise de gradiente de pH do solo feita por Rousk et al., (2009) evidenciou que em condições neutras ou ligeiramente alcalinas favoreciam o crescimento bacteriano, por outro lado, um pH ácido favoreceu o crescimento de fungos (pico do crescimento de fungos em pHs, cerca de pH 4,5). *Azotobacter*, por exemplo, só ocorrem em solos com pH superior a 6,0 característicos de regiões áridas e semiáridas (Michereff, et al., 2005).

A ocorrência dos solos ácidos é a maior restrição à agricultura, pois compromete a produtividade em todo o mundo (Watt, 2003, Famoso et al., 2010). No mundo, 60% dos solos ácidos ocorrem em países em desenvolvimento, na América do Sul, na África Central e no Sudeste da Ásia, onde a produção de alimentos é fundamental (Kochian et al., 2015; Grupta et al., 2013). Somente no Brasil, existem mais de 500 milhões de hectares cobertos com solos ácidos, compreendendo dois terços de seu território total, sendo a maior área de solos ácidos encontrada dentro de um único país (Vitorello et al., 2005). Normalmente, os valores de pH fora da faixa de 6,5 até 7,5 são indicativos para deficiência de nutrientes especialmente cálcio, fósforo e molibdênio e ocasionam quantidades excessivas de alumínio e manganês (Almeida et al., 1999; Grupta et al., 2013). Em muitos solos ácidos brasileiros, os teores de Al determinados com KCl 1 mol L⁻¹ (solução utilizada mundialmente para extrair o Al trocável) são extremamente altos (Wadt et al 2002; Cunha et al., 2015).

O Al é considerado um “metal pesado”, termo que refere-se aos elementos químicos que apresentam densidade maior que 5 a 6 g cm⁻³ (Tam, 2000). O Al é o metal mais abundante da crosta terrestre e um constituinte natural do solo presente como óxidos e alumínio silicatos não tóxicos às plantas (Kochian, 2015; Riaz et al., 2018). A espécie neutra de hidróxido de Al, Al(OH)₃⁰,

é a forma predominante de Al em valores de pH neutros e levemente ácidos. Assim, o Al é amplamente insolúvel sob essas condições. Em valores de pH acima de 7,5, forma-se Al(OH)_4^- que é solúvel novamente. Além disso, a hidrólise e a solubilidade do Al podem ser bastante afetadas pela quelação. O problema é ocasionado com a queda do pH do solo ($\text{pH} \leq 5$), porque o H^+ atua sobre os minerais liberando íons alumínio $\text{Al(H}_2\text{O)}_6^{3+}$, representado sem designar as moléculas de água associadas como Al^{3+} (McBride, et al., 1997; Broadley, et al., 2007; Palmer e Guerinot, 2009; Delhaize e Ryan, 1995; Matsumoto, 2000). O Al^{3+} fica predominantemente retido pelas cargas negativas das partículas de argila do solo e é a espécie química de Al tóxica às plantas. Esse metal é um dos componentes mais importantes na acidez do solo porque reage com a água, liberando íons de H^+ , como exemplificado na reação $\text{H}^+ (\text{Al(H}_2\text{O)}_6^{3+} \rightarrow \text{Al(H}_2\text{O)}_5(\text{OH})^{2+} + \text{H}^+$, acentuando a acidez do solo (Vitarello et al., 2005). O processo de hidrólise continua de acordo com as reações exemplificadas abaixo (para simplificar, os monômeros Al são escritos sem suas moléculas de água) (Tan, 2011).



A acidez do solo pode ser dividida em acidez trocável e acidez não trocável. A acidez trocável refere-se aos íons H^+ e Al^{3+} que estão retidos na superfície dos colóides por forças eletrostáticas. O Al^{3+} trocável é praticamente o único responsável pela acidez trocável, pois a quantidade de H^+ trocável em solos parece ser relativamente bem pequena. A acidez não trocável é representada pelo hidrogênio de ligação covalente, associado aos colóides com carga negativa variável e aos compostos de alumínio (Lopes, et al, 1991; Moreira et al., 2018).

No Brasil, a ocorrência de solos com potencial agrícola e afetados por problemas de toxidez por Al é da ordem de 60% (Abreu Jr. et al., (2003) e cerca de 70% das áreas cultivadas de cana-de-açúcar estão sobre solos ácidos (Sandanha et al., 2007). Além de plantas, os distúrbios causados pelo Al podem ser percebidos por micro-organismos e animais (Echart e Cavalli-Molina, 2001;

Masson et al., 2018; Aremu e Meshitsuka, 2006). Várias espécies de plantas são suscetíveis à concentração micromolar de Al e a concentração suportável de Al é no máximo de 0,1 mM (Blancaflor et al., 1998; Ahn et al., 2001; Rengel et al., 2002 e Hirano et al., 2006). A inibição do crescimento radicular é certamente a característica mais facilmente reconhecível da toxicidade do Al (30-90% do total de Al absorvido é absorvido na raiz), que pode ser amplamente marcada como uma medida da toxicidade do Al nas plantas (Čiamporová, 2002; Gupta et al., 2013; Schmitt et al., 2016). Nas plantas, a toxicidade do Al é associada fortemente a mudanças morfológicas e a homeostase celular da raiz porque o metal interage com a parede celular e a membrana plasmática, particularmente no ápice da raiz, ocasionando uma rápida inibição do crescimento radicular através da redução na expansão e alongação das células, afetando a arquitetura radicular reprimindo o crescimento lateral e inibindo o desenvolvimento de pelos radiculares (Barceló e Poschenrieder, 2002; Ma, et al., 2014; Kochian et al., 2015) que captam água e nutrientes essenciais para o desenvolvimento vegetal (Garzón et al., 2011; Ovečka e Takáč, 2013; Huang et al., 2009). Barceló et al., (1996) estudaram diferentes parâmetros relacionados com o crescimento das células das raízes em plantas de milho expostas por 24h a diferentes pHs ou a 50µM de Al. Os resultados obtidos nesse trabalho sugeriram que tanto o pH ácido como o Al diminuem a elasticidade das raízes de milho e reduzem a condutibilidade hidráulica aparente das raízes, indicando que o Al afeta severamente os parâmetros de relação de água da raiz.

O Al pode gerar danos peroxidativos na membrana plasmática, por indução de estresse oxidativo formando espécies reativas de oxigênio (Yamamoto, et al., 2002). E, afetar a fluidez da membrana por alterar o ambiente químico dos lipídios da membrana (Zhao et al., 1987) que pode abrir os canais de Ca^{2+} , causando um pequeno aumento na concentração de Ca^{2+} citoplasmático, o que pode ativar a síntese de calose. Bem como a toxicidade do Al descola o Ca^{2+} da membrana plasmática, interrompe as cascatas de sinalização do Ca^{2+} citosólico e bloqueia bombas de canal iônico, afetando fortemente a homeostase do Ca^{+2} (Rengele Zhang, 2003; Wiesenberger et al., 2007).

A exposição da planta ao Al pode inibir a aquisição de vários cátions essenciais, incluindo Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ e NH_4^+ (Singh et al., 2017). Essas alterações estão relacionadas às interações diretas do Al^{3+} com os canais iônicos da

membrana e a alterações no potencial da membrana plasmática (Pineros e Kochian 2001). Além disso, a interação do Al com a membrana plasmática pode levar à despolarização do potencial transmembranar (Xia et al., 2010) e/ou redução da H⁺-ATPase (Ahn et al., 2002) que, por sua vez, pode alterar as atividades de íons próximos à membrana plasmática e impedem a formação e manutenção do gradiente transmembranar H⁺ (Kochian et al., 2005). No entanto, em plantas, o Al pode causar tanto um efeito inibitório quanto estimulatório na atividade das H⁺-ATPases, dependendo da concentração utilizada (Ahn, et al 2006; Kim et al, 2010; Ryan et al., 2009; Ovečka e Takáč, 2013; Bose et al., 2011, Façanha e Okorokova-Façanha, 2002; Shen et al, 2005). Foi observado em plantas de milho que o Al é capaz de promover a estimulação da H⁺-ATPase em concentrações mais baixas do que as que iniciam a fitotoxicidade (Façanha e Okorokova-Façanha, 2002; Shen et al., 2005).

Devido aos estresses fisiológicos em plantas que crescem em solos ácidos com alta concentração de Al³⁺, duas categorias de mecanismo de tolerância ao Al têm sido propostas. (Ma, et al., 2002; Kochian, et al., 2015; Ryan et al., 2010). A primeira envolve mecanismos de tolerância que incluem a quelação do Al no citosol do Al, restrição do Al no apoplasto, a compartimentalização do Al nos vacúolos e ligações alumínio-proteínas, (Taylor, 1988; Simões et al., 2012; Ryan et al., 2001). A exemplificar, algumas espécies de plantas são conhecidas por serem hiperacumuladoras de Al devido à sua capacidade de acumular mais de 1 g Al kg⁻¹ de folhas secas (Jansen et al., 2002). Por exemplo, espécies como *Hydrangea macrophylla* podem acumular cerca de 3 g Al kg⁻¹ (Ma et al., 1995) e *Fagopyrum esculentum* até 15 g Al kg⁻¹ em suas folhas quando cultivadas em solos ácidos (Ma et al., 2001). A segunda categoria de mecanismo de tolerância ao Al está relacionada com a habilidade de excluir o Al do ápice da raiz e pode envolver diferentes mecanismos como formação de uma barreira de pH induzida pela planta na rizosfera ou no apoplasto da raiz, eliminação de ligantes quelados, mobilização do Al nas paredes celulares, permeabilidade seletiva do Al na membrana plasmática (Taylor, 1988). A exclusão de Al da extremidade das raízes também pode ser obtida pela eliminação de ácidos orgânicos (malato, citrato e oxalato) (Ma et al., 2007; Magalhães, 2010; Ryan et al., 2011, Garcia-Oliveira et al., 2013). Exemplificando: Arroz (Ma et al., 2002), cevada (Zhao et al., 2003; Ma et al., 2004), milho (Maron et al., 2010), trigo

(Ryan et al., 2009) e sorgo (Magalhaes et al., 2007) são exemplos de plantas que secretam citrato, enquanto centeio (Caniato et al., 2007; Li et al., 2000), aveia (Zheng et al., 1998) secretam citrato e malato.

Assim como as plantas, micro-organismos possuem a capacidade de secretar ácidos orgânicos (Sauerer et al., 2008; Naraian e Kumari, 2017). Por exemplo, o processo microbiano mais antigo na produção de ácido cítrico, com alto volume e baixo custo, é estabelecido pelo fungo filamentoso *Aspergillus niger* (Berovic et al., 2007; Anastassiadis et al., 2008). A levedura *Yarrowia lipolytica* também é um excelente modelo na produção de ácido cítrico (Berovic e Legisa, 2007; Papanikolaou et al., 2006; Sarris et al., 2011). Lobão e colaboradores (2007) propuseram que a tolerância de *Y. lipolytica* à concentração de 1 mM de alumínio seja devido à sua capacidade de secretar ácidos orgânicos.

A correlação de produção de ácidos orgânicos na presença de concentrações de Al foi comprovada por análise proteômica. Wang et al., (2013) comprovaram que há um acúmulo de citrato intracelular na levedura *Rhodotorula taiwanensis* RS1 quando crescida na presença de 100 mM de Al e aumentaram a expressão de malato-desidrogenase (enzima envolvida na produção de malato e oxaloacetato). Outras leveduras, *Cryptococcus humicola*, *Rhodotorula glutinis*, *Aspergillus flavus* Link, *Penicillium* sp., *Penicillium janthinellum* Biourge e *Trichoderma asperellum*, tolerantes ao Al (100-200 mM) em condições ácidas (pH 2,5-2,2) foram capazes de diminuir a quantidade do metal no meio de cultivo (Kawai et al., 2000). Fungos micorrízicos arbusculares também são capazes de proteger plantas contra a toxicidade do Al por meio da exsudação de ácidos orgânicos (Barceló e Poschenrieder, 2002; Seguel et al., 2013; Klugh e Cumming 2007; Seguel et al., 2013; Zhanget al., 2015).

Portanto, leveduras ancestrais simbióticas capazes de sobreviver em um ambiente ácido com disponibilidade de alumínio podem correlacionar o papel benéfico das interações microbianas na redução do estresse durante o estabelecimento da cana-de-açúcar ao longo de sua história e contribuição para o desenvolvimento vegetal.

2.3.2. Modulação de pH ambiente por micro-organismos

Em geral, as células vivas apresentam respostas a diferentes alterações externas que podem ocasionar um estresse celular. Assim, essas células devem ser capazes de sentir e se adaptar aos estresses ambientais para sobreviver e proliferar, requerendo uma rede de sinalização celular de controle e de defesa (Virgilio e Bertolini, 2017). O pH é um exemplo de fator ambiental que pode levar as células a sofrerem estresses, pois impacta diretamente em uma variedade de processos fisiológicos, bioquímicos e moleculares e, portanto, influencia o crescimento microbiano. A vista disso, os micro-organismos, como as leveduras, possuem diversos mecanismos que lhes permitem reconhecer e responder a condições ambientais adversas de alterações de pH (Maeda et al., 2012).

Embora a regulação do pH tenha sido mais intensamente investigada em *A. nidulans*, estudos com leveduras *S. cerevisiae*, *C. albicans* e *Y. lipolytica* também deram importantes contribuições (Peñalva e Arst 2004). Venturini Filho, 2010, por isso são considerados micro-organismos modelos de estudo. As leveduras do gênero *Saccharomyces* são as mais empregadas pelas usinas sulcroacoleiras do Brasil. É notável que em bioprocessos a seleção e a otimização de parâmetros sejam aspectos chave para o funcionamento adequado do metabolismo microbiano. Dentre os parâmetros estudados, o pH tem sido recorrente (Manpreet et al., 2005). Na fermentação alcoólica, por exemplo, o controle do pH relaciona-se diretamente à viabilidade das leveduras interferindo no rendimento do processo (Góes-Favoni, 2018). Segundo Souza, Monteiro (2011), as fermentações alcoólicas, podem se desenvolver em uma ampla faixa de pH, porém a faixa considerada ideal para o crescimento da levedura é ácida, entre pH 4,0 e 5,0. Em adição, é muito comum nos processos fermentativos ocorrer o reaproveitamento das leveduras, submetendo as células a um tratamento ácido em pH entre 2,5 a 3,0 a fim de controlar a contaminação bacteriana (Venturini Filho, 2010).

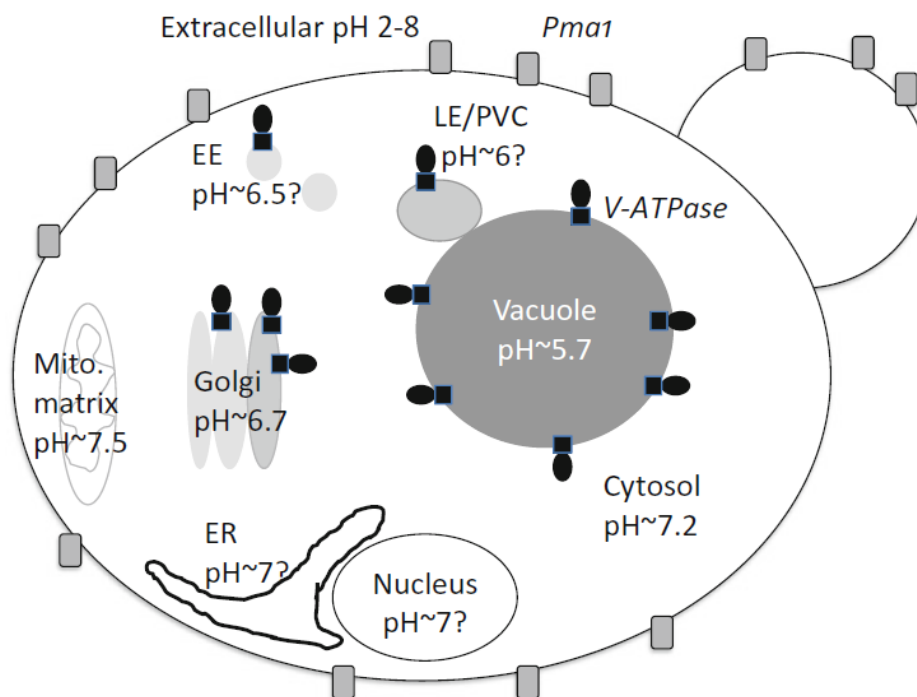
Também se tem descrito a biodiversidade e a ecologia de organismos eucarióticos que vivem em ambientes ácidos extremos (Aguilera et al., 2013). Interessantemente, esses ambientes abrigam leveduras, pertencentes aos gêneros *Cryptococcus* (Russo et al., 2008; Takashima et al., 2009), e *Rhodotorula* (Russo et al., 2008; Nguyen et al., 2001), e *Candida* (Russo et al., 2008; Lu et al.,

2007). Os fungos filamentosos *Acontium cylatium*, *Trichosporon cerebriae* e *Cephalosporium* sp. estão dentre os micro-organismos mais acidófilos devido à capacidade de crescer em valores em torno de 0 (Schleper et al., 1995). Em solos, por exemplo, geralmente, os fungos, mostram um pH ótimo de crescimento de 1-2 unidades de pH inferiores às bactérias presentes no mesmo ambiente, sugerindo que os fungos têm maior tolerância à acidez (MacDiarmid e Gardner, 1996). O alto nível de diversidade eucariótica encontrado em ambientes com pH ácido, incluindo espécies de levedura, demonstra que sistemas eucarióticos podem prosperar e dominar esses ambientes.

A acidez de solos, como já visto, coexiste com a toxicidade do Al. O entendimento dos mecanismos da toxicidade do Al e dos mecanismos e genes que conferem resistência ao Al tem sido requerido devido a seus malefícios em diversos mecanismos como já detalhado acima. Os efeitos da toxicidade do Al também são observados em fungos (Zel et al., 1993). Já que as leveduras e plantas vasculares compartilham de mecanismos de transporte semelhantes, elas têm demonstrado ser um excelente modelo para o estudo de resposta a diversos sinais ambientais, ressaltando os relativos ao pH e Al (Serrano, 1996, Avery, 2001; Ritchie e Raghupathi 2008). Como em plantas, o Al é capaz de inibir o crescimento da levedura *S. cerevisiae* (com 50% de inibição) em pH baixo (< 4,5), em concentrações micromolares (200 μ M de Al). Entretanto, o crescimento pode ser detectável em concentrações de até 600 -1000 μ M (MacDiarmid e Gardner, 1996; Schott e Gardner, 1997, Ezaki et al., 1998). A concentração de 0,5 mM inibe o crescimento da levedura *Sch. pombe* em 37% (Lobão, 2005), enquanto o crescimento da levedura *Y. lipolytica* não é interferido por concentrações de 1mM de Al, porém a morfogênese da levedura é afetada drasticamente com inibição do crescimento das hifas (Lobão, 2007). Kawai et al., (2000) encontraram seis cepas (*Cryptococcus humicola*, *R. glutinis*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium* sp., *P. janthinellum* e *Trichoderma asperellum*) capazes de crescer a pH 2,5 – 2,2 e de tolerar até 100-200 mM de Al. Kanazawa et al., (2005) isolaram 38 cepas ácido-tolerantes de solo ácido pertencem a duas espécies diferentes de leveduras, *Cryptococcus* sp. e *Candida palmioleophila*, capazes de crescer em meio contendo 100 mM de Al e pH 3,0. Adicionalmente, essas cepas também foram capazes de eliminar o Al dos meios de cultura. Interessantemente, também foi evidenciado que fungos micorrízicos arbusculares podem contribuir para que

plantas crescidas em solos ácidos com níveis fitotóxicos de Al^{3+} sejam tolerantes (Seguel et al., 2019).

Os efeitos do pH podem variar entre micro-organismos (Hu et al., 2006). A levedura *Saccharomyces* é um exemplo de fungo capaz de crescer em valores médios de pH variando de 2,5 a 8,5 (Matthews e Webb, 1991), porém o pH celular permanece estável em torno da neutralidade em resposta a mudanças no pH externo entre 3,0 e 7,5 (Orij et al., 2009). A habilidade de se adaptarem a uma ampla faixa de pH requer não apenas um sistema homeostático de pH interno, mas também uma maneira de garantir que as moléculas diretamente expostas ao ambiente, sejam sintetizadas apenas nos valores de pH ótimos em que possam funcionar. A compartimentalização das células eucarióticas permite separar fisicamente metabólitos, proteínas e, conseqüentemente, processos bioquímicos. A maioria das organelas possui seu próprio valor de pH específico, associado a processos que ocorrem nesses compartimentos (Roos e Boron, 1981) (Ver esquema 3). Apesar de ambientes extracelulares diversos e variáveis, os fungos mantêm um pH citosólico relativamente constante e numerosas organelas de pH lúmen distinto (Kane et al., 2016). Sendo assim, a manutenção do pH intracelular e o desenvolvimento de uma resposta às possíveis alterações são cruciais para a sobrevivência desses organismos em um ambiente ácido (Goffeau e Slayman 1981; Casal et al., 2008).



Esquema 3. Compartimentalização do pH e gradientes de pH em *S. cerevisiae* cultivada com glicose. São apresentados valores aproximados de pH para várias organelas da levedura. As organelas são abreviadas da seguinte forma: endossoma inicial (EE), endossoma tardio / compartimento pré-vacuolar (LE/PVC), retículo endoplasmático (ER) e mitocôndria (Mito). Os valores de pH indicados com um ponto de interrogação são indicados para compartimentos em que ainda não foram feitas medições de pH específicas. A V-ATPase é mostrada em preto e Pma1 como retângulos cinzas. (Adaptado de Kane et al., 2016).

No Reino Fungi, a regulação genética dependente do pH há muito tempo é discutida. Um dos primeiros trabalhos que descrevem o efeito do pH ambiente foi feito em 1982 por Nahas e colaboradores. Eles observaram que a secreção, mas não a síntese, das fosfatases alcalinas e ácidas pelo fungo *Neurospora crassa* eram dependentes do pH do meio do cultivo. Em 1986, Caddick et al., descreveram os primeiros genes envolvidos no sensoramento do pH ambiente em *Aspergillus nidulans*. A resposta ao pH é mediada por uma via metabólica constituída por pelo menos sete genes, o gene *pacC* que expressa o fator de transcrição PacC e os genes de sinalização *paIA*, B, C, F, H e I (Orejas et al., 1995. Denison, 2000). A proteína PacC é descrita como um ativador de transcrição de genes alcalino-específicos e uma repressora de genes ácido-específicos (Denison, 2000).

Apesar de ser uma levedura amplamente distribuída na natureza, ocupando diversos habitats (Davis, 2009, Winner e Hurley, 1964), *C. albicans* é considerada um patógeno oportunista e o pH extracelular é um parâmetro

importante que afeta sua capacidade de sobreviver, crescer e causar virulência no corpo humano. *C. albicans* é um modelo de estudos na regulação da filamentação dependente do pH porque a formação de hifas – o pH neutro a alcalino ($\geq 6,5$) induz a formação de hifas e o pH ácido ($< 6,5$) a inibe – é considerada um fator chave na patogênese já que mutantes não filamentosos são atenuados em virulência (Lo et al., 1997; Nobile et al., 2008; Kornitzer, 2019). Dentre os diversos genes responsivos ao pH em *C. albicans* (Bensen et al., 2004; Villa et al., 2020), está o fator de transcrição Rim101 (Davis et al., 2000) também encontrado em *Y. lipilytica* (Lambert et al., 1997; Prusky e Yakoby, 2003), *C. neoformans* (O'Meara et al., 2014) e *Ustilago maydis* (Aréchiga-Carvajal et al., 2000). A proteína Rim101p – homóloga da proteína PacC de *A. nidulans* – sofre processamento tanto em pH ácido como em pH alcalino (Li et al., 2004) e é fundamental para sua filamentação e patogênese (Du e Huang 2016, (Davis et al., 2000; Yuan et al., 2010).

Outras proteínas identificadas como importantes para a adaptação à mudança de pH são as duas β -glicosidases da parede celular: Phr1p e Phr2p (Fonzi, 1999). Phr1p é expresso em pH $\geq 5,5$, enquanto Phr2p é expresso em pH ≤ 5 (Saporito; Muhlschlegel e Fonzi, 1997; Kováčová et al., 2015; Popolo et al., 2017). Além disso, essas proteínas são essenciais para a patogênese: Phr1p é essencial para candidíase sistêmica (pH 7,4) e Phr2p é essencial para candidíase vaginal (pH 4) (Ghannoum et al., 1995, De Bernardis et al., 1998). A expressão dependente de pH de PHR1 e PHR2 é governada por uma via de transdução de sinal que culmina com a ativação do fator de transcrição Rim101p onde a Rim101p induz PHR1 e reprime a expressão de PHR2 em um pH alcalino (Davis et al., 2000 a-b).

Outros fungos patogênicos, como *Penicillium expansum*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, *Botrytis cinerea* (Prusky et al., 2003) e *Sclerotinia sclerotiorum* (Bateman e Beer, 1965; (Rollins and Dickman, 2001), 2001; Vautard-Mey e Fevre, 2003) usam a acidificação do tecido em seu ataque. A acidificação do tecido é aumentada pelo acúmulo de ácidos orgânicos e/ou excreção de H^+ . A capacidade de *Fusarium oxysporum* de acidificar o pH extracelular foi demonstrada pela ativação da membrana H^+ -ATPase (Brandao et al., 1992). *S. sclerotiorum* e *Botrytis* diminuem o pH do hospedeiro secretando quantidades significativas de ácido oxálico (Manteau et al., 2003; Rollins e Dickman, 2001),

enquanto *Penicillium* (Prusky et al., 2003) e *Aspergillus* (Ruijter et al., 1999) secretam principalmente os ácidos glucônico e cítrico. *P. expansum* acidifica o tecido para níveis de pH de 3,5 a 4,0 (Prusky et al., 2003).

A homeostase desequilibrada do pH é igualmente prejudicial para os micro-organismos, muitos dos quais são rotineiramente expostos a variações extremas de pH no ambiente. A fim de manter a homeostase do pH fúngico, uma rede de bombas de prótons colabora para manter a constância das concentrações citoplasmáticas de prótons, energizando simultaneamente o transporte secundário de íons e nutrientes essenciais. Em fungos, como em plantas, a H^+ -ATPase da membrana plasmática é predominantemente tipo-P (Portillo, 2000; Kühlbrandt, 2004). A família das ATPases do tipo-P inclui uma ampla variedade de bombas específicas para cátion, como as K^+ -, Cd^{2+} -, Cu^{2+} -ATPases das células bacterianas, Ca^{2+} -ATPases das células animais, vegetais e fungícas e Na^+/K^+ -, H^+/K^+ -ATPases em células animais (Palmgren e Nissen, 2011). O uso de sistemas antiportos H^+ , permeabilidade reduzida a prótons para mantê-los em baixa concentração intracelular também são mecanismos de resistência a estresse adotados por micro-organismos a fim de manter a homeostase do pH durante o crescimento (Liu et al., 2015). A regulação coordenada da atividade de Pma1 e H^+ -ATPase vacuolar (V-ATPase) também é crucial para a manutenção da homeostase do pH citosólico em leveduras [Martinez-Munoz e Kane, 2008; ver esquema 2).

Acredita-se, portanto, que as leveduras adaptadas ao estresse oriundo de ambientes ácidos com exposição a teores tóxicos Al possam desempenhar papéis críticos na resistência ao Al em espécies vegetais, permitindo que as plantas colonizem e cresçam em ambientes edáficos ácidos desfavoráveis.

2.4. Micro-organismos solubilizadores de fósforo (MSF)

Baixo pH, teor alto de alumínio e baixa disponibilidade de fosfato coexistem em solo ácidos e inibem severamente a produção agrícola mundial. Para que as culturas mantenham o crescimento em solos ácidos, elas precisam ser adaptáveis a pH baixo (níveis tóxicos de H^+), toxicidade de Al e/ou deficiência de fósforo (P) (Kochian et al., 2004). Os efeitos do pH na absorção pelas raízes também são relevantes. Entre o pH 4,0 e 7,0 a adsorção de fosfato por raízes

isoladas de cevada ou milho diminui acentuadamente com o aumento do pH (Barrow, 2016).

A importância do P é devido ele ser macronutriente essencial ao metabolismo das plantas e de micro-organismos. Faz parte da constituição da molécula que atua na transferência de energia da célula, na respiração, na fotossíntese, na formação dos fosfolípidios de ácidos nucleicos e sinalização celular (Bünemann et al., 2011; Frossard et al., 2011).

No solo, os compostos de P podem estar alocados em diferentes formas: fósforos inorgânicos (P_i) e fósforos orgânicos (P_o) (Richardson, 2001). O P_i são as formas insolúveis de P, tais como fosfato tricálcico (Ca_3PO_4), fosfato de alumínio (Al_3PO_4), fosfato de ferro (Fe_3PO_4). Em solos brasileiros, o P é encontrado em maior quantidade como Al_3PO_4 e Fe_3PO_4 (Nahas, 2002). O P_o encontrado no solo representa em torno de 10% a 50% do P total do solo destacando as principais fontes os inositolis-fosfato (10% a 50%), os fosfolípidios (1% a 5%) e os ácidos nucleicos (0,2% a 2,5%) (Nahas et al., 1994). Uma parte do P no solo está imobilizada na biomassa microbiana que é de 1% a 10% (Richardson, 2001).

As raízes absorvem o P como o íon $H_2PO_4^-$ (Esquema 3). Apesar dos teores de P no solo serem relativamente elevados (400 a 1200 mg/kg de solo), a concentração de P-solúvel, disponível para assimilação pelas raízes é muito baixa, normalmente 1 mg/kg de solo ou menos (Raghothama, 1999). Os P_o podem ser convertidos em formas P-solúvel por organismos solubilizadores de P (Gupta et al., 2007; Song et al., 2008; Khan et al., 2013; Sharma et al., 2013).

Os micro-organismos solubilizadores de fósforo (MSF) são aqueles micro-organismos capazes de solubilizar fósforo, aumentando a disponibilidade do nutriente para planta e, conseqüentemente, promoverem o crescimento vegetal. Segundo Silva Filho et al., (2002), as populações de MSF existentes nos solos são entre 10^4 e 10^7 gramas de solo. Destaca-se na literatura os fungos *Aspergillus* e *Penicillium* (Khan et al., 2010; Chaiet al., 2011), os quais já foram isolados de solos rizosféricos de cana-de-açúcar (*Saccharum spp. L.*) na Estação Experimental de Cana-de-Açúcar do Carpina (UFRPE) em Pernambuco (Coutinho et al., 2016). Entre os fungos leveduriformes, estão os gêneros *Candida*, *Geotrichum*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* e *Williopsis* capazes de solubilizar fosfato inorgânico *in vitro* (Al-Falih e Wainwright, 1995; Al-Falih, 2005, Srinivasan et al., 2012, Sharma et al., 2013). Entre as bactérias,

destacam-se os gêneros *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Erwinia*, *Paenibacillus* e *Bacillus* (Silva Filho e Vidor, 2001; Verma e Ladha, 2001; Garg et al., 2001; Sridevi e Mallaiah, 2009; Wanget al., 2012).

Os micro-organismos afetam diretamente a habilidade das plantas em adquirir P do solo por vários mecanismos (ver esquema 3). Inúmeros fatores influenciam na solubilização do P_i , entre eles se destacam a produção de ácidos orgânicos pelos micro-organismos (Hariprasad e Niranjana, 2009).



Esquema 4. Diagrama representativo da dinâmica do fósforo do solo. As fontes de fósforo no solo são: fósforo orgânico (P_o), fósforo inorgânico (P_i) e fósforo da biomassa microbiana. Os micro-organismos presentes do solo estão envolvidos nos processos de solubilização, mineralização e imobilização do fósforo, desempenhando papel fundamental no ciclo biogeoquímico desse elemento, sendo importantes na mediação da disponibilidade de fósforo para as plantas. (Adaptada de Richardson e Simpson, 2011).

Os ácidos orgânicos são eficazes na solubilização de formas precipitadas de P no solo (por exemplo, Fe-P e Al-P em solos ácidos, Ca-P em solos alcalinos) (Jones, 1998). Em particular, nos solos tropicais, o P aparece como fator limitante em 96% das áreas (Goedert, 1983; Sanches e Salinas, 1981) devido à sua precipitação com hidróxidos de Al^{3+} e de Fe^{+3} (Fontes e Weed, 1996; Whitelaw, 1999). Em solos ácidos, a exsudação de malato em resposta à privação de P_i tem sido sugerida como um mecanismo de mobilização de P em várias espécies de plantas cultivadas (Hoffland et al., 1989; Hinsinger, 2001; Sas et al., 2001). Liang et al., (2013) sugeriram que a exsudação do malato pela ponta da raiz pode ser crítica para a adaptação da soja (*Glycine max*, genótipo HN89) à toxicidade de Al e à deficiência de fósforo em solos ácidos. Pois, observaram que a planta liberou mais malato em condições que imitam as condições dos solos ácidos (pH baixo + P + Al). Também notaram que a adição de P aos solos ácidos pode estimular a tolerância ao Al.

O uso de MSF pode ser uma alternativa a fim de disponibilizar mais nutrientes para as plantas. Acredita-se que a capacidade de solubilização de P pelos micro-organismos se correlaciona, principalmente, com o potencial de liberação de ácidos orgânicos (Mendes et al., 2013) que dissolvem diretamente o material fosfático e/ou quelem cátions que acompanham o ânion fosfato (Marra et al., 2012). Por exemplo, Barroso e Nahas (2008) descreveram que a solubilização de P por *Aspergillus niger* está relacionada à produção de ácidos orgânicos, principalmente os ácidos glucônico, oxálico e succínio.

Especula-se que a alta liberação de malato nas raízes esteja envolvida em outras respostas das plantas ao meio ambiente, como nas interações entre plantas e micro-organismos do solo (Walker et al., 2003; Rudrappa et al., 2008). O malato poderia fornecer mais carbono para micro-organismos benéficos. A inoculação de plantas com MSF tem sido proposta para uma agricultura mais sustentável com propósito de diminuir o uso de fertilizantes fosfatados que acarretam impactos ambientais negativos ao longo do tempo. Uma variedade de produtos à base de biofertilizantes usando MSF, tanto bactérias quanto fungos, foi desenvolvida como produtos comerciais e em muitos casos mostraram resultados positivos em vários ensaios de campo (Antoun, 2012). Como exemplo, o fertilizante JumpStart® contém o fungo *Penicillium bilaii* comercialmente aplicado nas sementes trigo, canola, mostarda, lentilha, alfafa e ervilha (Leggett et al., 2015).

O uso de micro-organismos com alta capacidade de solubilização de P presente no solo com a finalidade de aumentar a disponibilidade do nutriente para as plantas é uma alternativa benéfica na agricultura, porém o aumento da disponibilidade de P mediante a inoculação com micro-organismos é extremamente complexo. No entanto, a escolha de micro-organismos ancestrais já adaptados à cultura vegetal pode representar um novo viés para o desenvolvimento futuro de novos inóculos eficientes, pois esses micro-organismos possuem vantagem ecológica seletiva sobre os demais micro-organismos presentes no solo.

2.5. Micro-organismos solubilizadores de zinco (MSZ)

Os elementos B (boro), Cl (cloro), Cu (cobre), Fe (ferro), Mn (manganês), Mo (molibdênio) e Zn (zinco) denominados de micronutrientes são essenciais para o crescimento das plantas, mas requerido em quantidades menores que os macronutrientes N (nitrogênio), P (fósforo), K (potássio), Ca (cálcio), Mg (magnésio) e S (enxofre) (Lopes et al., 2006). Especialmente, o Zn é um elemento essencial para o desenvolvimento das plantas, pois é um mineral presente em diversos processos metabólicos da planta atuando como co-fator enzimático em mais de 300 enzimas (Mccallet al., 2000). Atua no metabolismo de fixação de nitrogênio, no metabolismo fotossintético na síntese de clorofila e na atividade da anidrase carbônica, enzima responsável pelo transporte de CO_2 , promove a resistência a danos oxidativos em função da relação com o superóxido desmutase, enzima que converte superóxido em radicais de hidrogênio e água (Alloway, 2004) e é necessário para a produção dos fitormônios, ácido abscísico, auxina, giberelinas e citocininas (Imranet al., 2014; Younaset al., 2014). Dentre as auxinas, Zn desempenha um papel essencial na formação de triptofano, que é um precursor da biossíntese do AIA (Beulah Jerlin, et al., 2017).

Para o crescimento saudável, nos tecidos das plantas, o Zn é necessário em concentrações de 5 a 100 mg/kg (Iqbal, et al., 2010). A disponibilidade de micronutrientes às plantas é influenciada por muitos fatores, sendo o pH do solo um dos mais importantes para o elemento Zn (Abreu et al., 2001). O Zn encontra-se, predominantemente, nas frações: solúvel, trocável e associada a carbonatos (Sobrinho et al. 1993; Kiekens, 1995) e sua adsorção é influenciada pelo pH. As plantas absorvem o Zn como cátion divalente (Zn^{2+}) (Vidyashreeet al 2018), que é a mais comum na solução do solo até valores de pH 7,0, enquanto que em valores acima desse pH, a forma predominante é o ZnOH^+ . Em solução com valores superior a pH 9,0 o Zn(OH)_2^0 , espécies neutras, predominam. A atividade do Zn na solução do solo diminui cem vezes para cada unidade de aumento do pH (Norvell e Lindsay, 1969; Hermes e Santos, 2000). Quando o pH do solo aumenta, o Zn é mais adsorvido pelos óxidos e hidróxidos de Fe, de Al (Cavallaro e McBride, 1984; Okazaki et al., 1986; Stahl e James, 1991a) e de manganês (Stahl e James, 1991b). Além disso, pode-se ser calculado que em pH 8,0 a atividade de Zn^{+2} na solução do solo está ao redor de 0,07 mg/L, enquanto em pH

5,0 está 6,5 mg/L (Alloway, 1995). Em solos muito ácidos (pH <4,0), as concentrações de Zn na solução do solo encontra-se a 7137 µ/L, evidenciando a forte influência do pH sob o Zn (Kanata-Pendias e Pendias (2000).

O Zn não é um metal muito abundante na natureza, seu teor total no solo varia entre 10 a 300 mg/kg em Litossolo dase substrato basalto a 1,0 mg/kg em Areia Quartzosa (Valadares, 1995). Em solos tropicais, o Zn apresenta-se com baixa disponibilidade para as plantas devido ao processo de adsorção do mesmo no solo (Dechen e Nachtigall, 2007). Na solução do solo, a concentração de Zn também é muito baixa (4 a 270 µ/L, dependendo do solo) quando comparada ao conteúdo médio total de Zn no solos (50 mg/kg). Sua baixa disponibilidade sugere, portanto, a necessidade de fornecimento frequente de Zn por meio de fertilizantes para um melhor desenvolvimento vegetal (Saravananet al., 2007).

Os fertilizantes de sulfato de zinco (ZnSO₄) são fontes tradicionais de Zn e contêm 33% desse micronutriente, porém apenas 4 a 8% do Zn do total aplicado está disponível para a planta (Hussainet al., 2018). O restante se transforma em diferentes formas insolúveis, dependendo dos tipos de solo e reações químicas do solo, totalmente indisponível dentro de sete dias após a aplicação (Rattan e Shukla, 1991). Os fertilizantes de óxido de zinco (ZnO) são fontes mais baratas e insolúveis e contêm 80% de Zn e são fontes para micro-organismos solubilizadores de zinco (MSZ), que ao solubilizá-los os tornam disponíveis para as plantas (Hussain et al., 2018).

A solubilização de Zn por micro-organismos pode ser um benefício econômico. Ela ocorre por uma série de mecanismos que incluem a excreção de metabólitos como ácidos orgânicos, extrusão de prótons ou produção de agentes quelantes (Sayer et al., 1995). Fungos são capazes de converter compostos de Zn insolúveis em compostos solúveis e melhorar a concentração de Zn nos tecidos da planta. Os gêneros mais descritos são *Aspergillus* e *Penicillium* (Burgstaller e Schinner, 1993; Sayer et al., 1995). *A. niger* é um fungo capaz de produzir ácido cítrico e oxálico e capaz de transformar compostos inorgânicos (ZnO, Zn₃(PO₄)₂ e Co₃(PO₄)₂) em compostos orgânicos através da solubilização (Sayer e Gadd, 1997).

Os estudos demonstraram que os fungos filamentosos poderiam ser efetivamente usados para aumentar a disponibilidade de Zn para as plantas. No entanto, os relatos sobre essa capacidade em leveduras são escassos podendo

criar, completamente, novas perspectivas para a aplicação biotecnológica desses micro-organismos. Assim, igualmente a solubilização de P, escolher micro-organismos já adaptados ao ambiente vegetal aumenta as chances de estabilidade das comunidades microbianas em interações com as plantas, tornando os inóculos desenvolvidos com propósito de contribuir para aquisição de nutrientes mais eficientes na melhoria da produtividade agrícola.

2.6. Micro-organismos produtores de compostos indólicos

A auxina é a classe dos hormônios vegetais mais estudada, com habilidades de regular respostas de crescimento às plantas (Teale et al., 2006). O ácido indol-3-acético (AIA) foi a primeira auxina identificada, mas somente isolada em 1928 pelo fisiologista vegetal Frits W. Went, e até hoje é o principal representante natural dessa classe de compostos.

Em plantas, a biossíntese geral dos compostos indólicos ocorre principalmente em tecidos com intensa divisão celular e crescimento, por exemplo, na parte aérea da planta em ápices caulinares e folhas jovens. E, é rapidamente transportado para as raízes através do floema (Eklund et al., 2010; Tromas e Perrot-Rechenmann 2010). Esse fitormônio está envolvido em todos os aspectos do desenvolvimento e do crescimento vegetal (Simon e Petrášek, 2011) ressaltando: (i) a expansão celular; (ii) o fototropismo e o gravitropismo; (iii) a regulação da dominância apical e (iv) a formação de raízes laterais e adventícias. No caso específico de desenvolvimento radicular, em plantas dicotiledôneas, a auxina induz a formação de raízes laterais, enquanto em monocotiledôneas, induz a formação de raiz adventícia (McSteen et al., 2010).

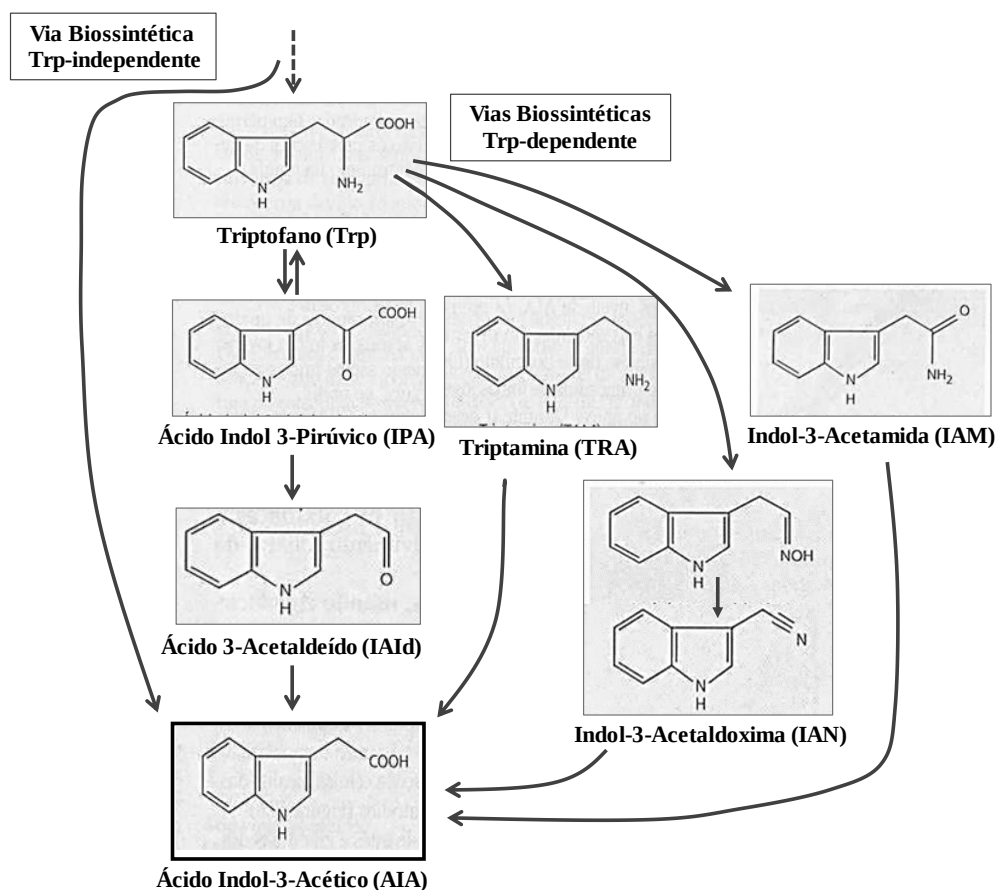
O AIA é a auxina mais biologicamente ativa (Normanly, 2010) sintetizado, além de plantas, por micro-organismos, tais como fungos filamentosos (Krause et al., 2015) ou leveduriformes (Limtong e Koowadjanakul, 2012) e bactérias (Emani et al., 2019), sugerindo que esse hormônio poderia ter um papel endógeno nesses organismos (Gruen, 1959; Ulrich, 1960).

Interessantemente, como ocorre em plantas, os efeitos da auxina estão relacionados à morfogênese fúngica (Chanclud e Morel, 2016). Em leveduras, os relatos de Robinson e Stier, em 1941, foram um dos pioneiros sobre formação de auxina em culturas de leveduras. Entretanto, esse estudo não teve continuação e

as pesquisas subsequentes foram realizadas somente em modelos vegetais. Somente em 2004, Prusty e colaboradores demonstraram essa resposta novamente, relatando que o AIA exógeno regulava a filamentação da levedura *S.s cerevisiae* induzindo a expressão de genes responsáveis pela transição morfológica da forma de leveduriforme para pseudo-hifa. Mais recentemente, os dados de Dutra (2010) e Cogo et al., (2018) consolidaram o efeito do AIA na indução da transição levedura-hifa em *Y. lipolytica*. No fungo *Fusarium oxysporum lycopersici*, patógeno do tomate, o AIA reduziu a germinação de esporos (Sharaf e Farrag, 2004). Portanto, os efeitos de auxinas na fisiologia fúngica podem diferir fortemente de uma espécie para outra e dependem da concentração testada (Kulkarni et al., 2013).

O AIA produzido por micro-organismos é ativo em plantas e cada vez mais tem sido alvo dos estudos que buscam elucidar as relações e estratégias adaptativas comuns entre micro-organismos e plantas. Por exemplo, o AIA produzido pelo fungo *Ustilago esculentaa* aumentou o número de raízes laterais em *Nicotiana benthamiana* e *Arabidopsis thaliana* *in vitro* (Fu et al., 2015). O aumento radicular pode trazer inúmeros ganhos na produtividade agrícola, principalmente pelo aumento na absorção de água e nutrientes, e consequentemente, no crescimento da planta (Berg, 2009).

Evidências filogenéticas sugerem que a biossíntese do AIA evoluiu independentemente nos organismos (Sun et al., 2014), embora as vias biossintéticas do AIA em micro-organismos e plantas sejam similares, incluindo uma via independente de triptofano (Rao et al., 2010). O esquema 3 especifica as principais rotas de biossíntese dependentes de triptofano (Trp-dependentes) e independentes de Trp (Trp-independentes), ambas as rotas são conservadas em plantas (Mano e Nemoto 2012) e muitos micro-organismos sintetizadores de auxinas (Spaepen et al., 2007).



Esquema 5. Vias de biossíntese de Ácido Indol-3-Acético (AIA) (Adaptação de Taiz e Zeiger, 1998 e Spaepen et al., 2007).

Em plantas, a via Trp-independente tem informações limitadas (Zhang et al., 2008; Ouyang et al., 2000), enquanto as vias Trp-dependentes propostas são: IAM, IPA, TRA e IAN (Mano et al., 2012). Em fungos, os possíveis intermediários de AIA relatados são IAAd, IPA, TRA IAM (Chung e Tzeng, 2004; Chunget al., 2003) e IAN (Reineke et al., 2008). No trabalho de Xin et al., (2009), as leveduras, *R. graminis*, *R. mucilaginosa* e *R. glutinis*, só sintetizaram AIA quando incubadas com Trp, enquanto no trabalho de Sun et al., (2014), as leveduras, *Aureobasidium pullulans*, *Candida sp.*, *Cryptococcus flavus* e *U. esculenta* sintetizaram AIA independente da presença ou não de Trp.

Em bactérias fixadoras de nitrogênio, as auxinas são necessárias para o início da formação do nódulo durante a simbiose (Hirsch e Fang, 1994). Zakharova e colaboradores (1999) demonstraram que *Azospirillum brasilense*, uma bactéria fixadora de nitrogênio, é capaz de sintetizar AIA por 3 vias biossintéticas (IPA, IAM, e IAN) e, em geral, são as principais vias bioquímicas em bactérias (Patten et al., 1996; Spaepen et al., 2007).

Portanto, durante a interação dos micro-organismos com as plantas, em seu habitat ecológico, torna-se óbvio um processo recíproco de sinalização mediada por AIA (Lambrecht et al., 2000). Neste contexto, a síntese de AIA pelas leveduras residentes de cana-de-açúcar pode ter sido fundamental na ecologia dessas interações que envolvem o estabelecimento da microbiota na cultura de cana-de-açúcar no decorrer da história. Essa caracterização é importante para compreender como esses micro-organismos poderiam atuar no desenvolvimento das plantas.

Em adição, alguns estudos descreveram a interação entre bactérias e cana-de-açúcar, na região Sudeste do país (Baldani et al., 2002; Silva, 2010) e outras regiões (Santos et al., 2012; Silva, 2011). Porém, em nenhum destes trabalhos trazem dados relacionados às potencialidades de leveduras isoladas de cana-de-açúcar.

3. OBJETIVOS

Almejou o isolamento e identificação de leveduras de pan-microbiota da cana-de-açúcar, e sua caracterização funcional quanto a capacidade de produção de elementos promotores do crescimento vegetal, buscando esclarecer de que maneira esses micro-organismos poderiam ter auxiliado no estabelecimento desta cultura nos mais variados ambientes intertropicais, e assim fundamentar o desenvolvimento de novos inóculos e manejos que potencializem a abundância e/ou a eficiência destas interações ancestrais, em benefício da produtividade dos híbridos interespecíficos atuais.

3.1. Objetivos específicos

- Identificar as espécies de levedura associadas ao colmo da cana-de-açúcar;
- Associar a importância das leveduras no estabelecimento da cultura de cana-de-açúcar;
- Avaliar a capacidade das leveduras isoladas na solubilização dos nutrientes fosfato e zinco;
- Avaliar a resistência ao pH ácido durante o crescimento das leveduras isoladas;
- Avaliar a tolerância ao alumínio durante o crescimento das leveduras isoladas;

- Avaliar a capacidade das leveduras isoladas em produzir compostos indólicos e, especificamente o ácido indol-3-acético;
- Determinar quais leveduras são as mais promissoras para as características analisadas e possível promoção do crescimento vegetal.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Isolamento de leveduras da cana-de-açúcar

O Isolamento das leveduras da cana-de-açúcar foi executado por Gislaine (2011) e descrito a seguir brevemente.

4.1.1. Material vegetal

As leveduras foram isoladas do colmo de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) de três variedades distintas (CB56-155, RB86-7515 e SP80-3280). As variedades foram obtidas na Estação Experimental da PESAGRO em Campos dos Goytacazes. As variedades foram escolhidas, pois foram as mais eficientes em um estudo preliminar, no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2005, que avaliou a bioenergética de 24 variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) (Ferreira, 2009).

O melhoramento genético da cana-de-açúcar no Brasil teve início em 1934 com trabalhos realizados no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) e na estação experimental de Campos-RJ (CB), selecionadas pelo pesquisador Frederico Menezes Veiga e que compõem o marco histórico da cultura no Brasil e no exterior. Na década de 80 surgiram os programas de melhoramento genético do Centro de Tecnologia Copersucar (SP), atualmente denominado de Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) e do Planalsucar, que hoje é denominada de Rede

Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético (RIDESA - RB) (Figueiredo, 2010).

4.1.1.1. Características Agronômicas das Variedades CB56-155

Essa variedade possui poucas características, pois são variedades muito antigas e pouco usuais na utilidade.

4.1.1.2. Características Agronômicas das Variedades RB86-7515

Os resultados obtidos nos ensaios conduzidos nas usinas e destilarias mostraram que essa variedade tem melhor desempenho em solos de textura leve e fertilidade média. Esta variedade tem apresentado boa capacidade de brotação mesmo em plantio tardio sob baixas temperaturas. Em cana planta, no plantio de ano e meio, pode ocorrer tombamento ao final do ciclo devido a crescimento vigoroso com Suscetibilidade às estrias vermelhas, que reduzem sua produtividade; quebra facilmente os ponteiros com ventos fortes (Udop, 2020, Socicana, 2020a).

4.1.1.3. Características Agronômicas das Variedades SP80-3280

É uma das variedades comerciais mais utilizadas em São Paulo. Destaca-se pelo alto teor de sacarose e produtividade em soqueira; o seu perfilhamento é intermediário e o fechamento das entre linhas é bom, devido ao crescimento inicial vigoroso; floresce, no entanto apresenta pouca isoporização; seu teor de fibra é alto, o tombamento é regular e a exigência em fertilidade do solo é média; tem boa brotação de soqueira; apresenta sensibilidade média a herbicidas e resistência ao carvão, mosaico e ferrugem e é tolerante à escaldadura; não tem mostrado sintomas da síndrome do amarelecimento; apresenta suscetibilidade à broca (Socicana, 2020b). É extremamente exigente em solos férteis e úmidos; nestas condições produz bem. É extremamente exigente em solos férteis e úmidos; nestas condições produz bem (Udop, 2020).

4.1.2. Tratamento das amostras vegetais – Desinfestação e Obtenção de Extrato Vegetal

Colmos de cana-de-açúcar coletados no campo, na Estação Experimental da PESAGRO em Campos dos Goytacazes. Foram coletados dois a três colmos de cada uma das três variedades de cana-de-açúcar, que foram transportados até o laboratório onde puderam ser lavados em água corrente.

Para desinfestação, após a lavagem extensiva dos colmos em água corrente, procedeu-se a imersão em: i) álcool 70% por 1 minuto, ii) água sanitária 2% por 2 minutos, iii) álcool 70 % por 30 segundos e iv) duas lavagens em água destilada estéril.

Foram reservados 50 mL da última água de lavagem para verificação da eficiência do procedimento de desinfestação, mediante posterior semeadura sob as mesmas condições a que seriam expostos os extratos vegetais. A desinfestação superficial não previu a sobrevivência dos micro-organismos existentes em relação à planta.

Os colmos foram colocados para secar sobre papel filtro estéril em fluxo laminar vertical, suas folhas foram removidas e descartadas e foram separadas as porções aéreas e radiculares. As diferentes amostras, segundo a região da planta e variedade, foram cortadas em fatias finas com lâminas de bisturi estéreis e maceradas com PBS na proporção 1:2 (p:v) em gral e pistilo também estéreis para a obtenção dos extratos vegetais.

4.1.3. Plaqueamento e Isolamento

Os extratos obtidos nos experimentos de desinfestação superficial foram levados ao fluxo laminar e grosseiramente filtrados em gaze estéril. Amostras de 100 µL desses filtrados foram semeadas por espalhamento com alça de Drigalski em placa de Petri de 9 cm preenchidas com meio ágar Sabouraud (2% D(+) glicose; 0,5% peptona de carne; 0,5% peptona de caseína, pH 6,0, adicionado de 50 µg/mL do antibiótico cloranfenicol - Sigma).

As placas inoculadas foram depositadas em estufa à temperatura de 30°C, por 3 a 7 dias, para que houvesse o crescimento de colônias a partir das amostras semeadas. As colônias obtidas a partir das extrações foram então

isoladas e purificadas através de passagens sucessivas para novas placas até a obtenção de culturas puras.

4.2. Identificação molecular das leveduras isoladas de cana-de-açúcar

4.2.1. Extração do DNA genômico

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

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) e, resumidamente, descrita a seguir.

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

A extração foi dividida em três etapas.

Na primeira etapa, de lavagem das células, 10 mL da cultura foram adicionados em um tubo tipo falcon de 15 mL e levado para centrifugar sob rotação de 4000g por 10 minutos a 4°C. Posteriormente a esse tempo, o sobrenadante descartado. Em seguida, foram adicionados 10 mL de água ultrapura estéril junto ao *pellet* e, suavemente, homogeneizado para ser ocorrer outra centrifugação a 4000g por 10 minutos a 4°C. Novamente foi descartado o sobrenadante e o *pellet* foi ressuspensionado em 2 mL da solução SCDE (1 M de sorbitol, 10 mM de citrato de sódio pH 5,8, 1 mM de EDTA, 10 mM de DTT) e incubado a 37°C durante 1 hora.

Na seguinte etapa, de isolamento do DNA, foram adicionados 3,5 mL da Solução A do kit de extração de DNA (*Easy-DNA™ Kit*) ao tubo em que a amostra estava sendo incubada na etapa anterior. A solução foi homogeneizada em *vortex* por 1 segundo retornada a incubada 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 para

então ocorrer a centrifugação sob rotação de 1000g por 20 minutos a 4°C a fim de separar as fases. Cuidadosamente, a parte superior (fase aquosa) foi descartada em um novo tubo tipo falcon.

Na última etapa, de precipitação do DNA, foram adicionados 10 mL de etanol 100% gelado no tubo que continha a amostra da fase aquosa, homogeneizando rapidamente e incubando por 30 minutos no gelo. Posteriormente, houve outra centrifugação a 4000g por 15 minutos a 4°C. Depois desse tempo o etanol que estava no sobrenadante foi descartado. Em seguida, foram adicionados mais 5 mL de etanol 80% gelado e o tubo misturado por inversão até ficar homogêneo e então novamente submetidos à centrifugação a 4000g por 5 minutos a 4°C, e o etanol foi removido de novo.

Os tubos foram deixados secar ao ar livre por 5 minutos para evaporação total do etanol.

Por fim, o *pellet* foi ressuscitado em 100 µL de tampão TE (tampão EDTA) do *kit* de extração de DNA com 2 µL de RNase 2 mg/mL para uma concentração final de 40 µL/mL e incubado a 37°C por 30 minutos. O sobrenadante foi transferido para um microtubo do tipo *ependorf* e estocado a 4°C.

Após a extração, para se estimar a concentração do DNA foi utilizado o aparelho *Nano Drop 2000 – Spectrophotometer (Thermo Scientific)*.

4.2.2. Amplificação do DNA 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, Mg^{2+} , desoxirribo nucleotídeos trifosfatos (dNTPs), Taq DNA polimerase recombinante, e *Pyrococcus species GB-D* termoestável polimerase.

Todos os produtos de PCR foram submetidos por eletroforese em gel de agarose 1,5%, em tampão TAE 1x (2 M Tris, 1 M ácido acético, 0,05 M EDTA), utilizando marcador molecular de DNA *Invitrogen* 100 bp, a 2 horas a 100V. Os géis foram corados com solução de brometo de etídio, visualizados sob luz ultravioleta e fotografados em um sistema de fotodocumentação de gel (*Image Quant Las 500*).

4.2.2.1. Amplificação da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*)

Foram utilizados os seguintes iniciadores (*primers*) confeccionados pela Prodimol Biotecnologia (esquema 6):

-ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')

-ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')

Os *primers* amplificam a região esquematizada abaixo, 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⁻¹, 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 em 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.

4.2.2.2. Amplificação da região D1/D2 do DNAr

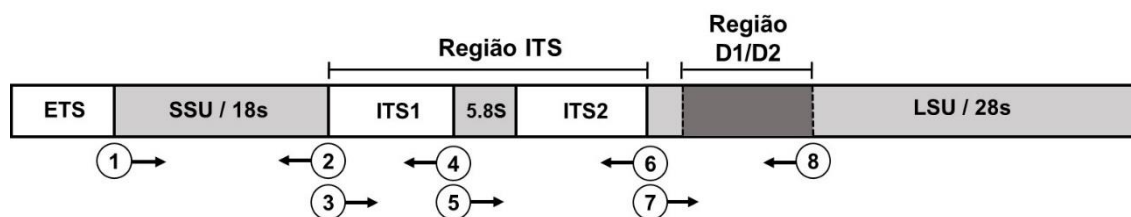
Foram utilizados os seguintes iniciadores (*primers*) confeccionados pela Prodimol Biotecnologia (esquema 6):

- NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3')

- NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3')

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⁻¹, 45 µL do o *Platinum® PCR SuperMix High Fidelity* e 1 µL de água deionizada estéril.

O programa consistiu em uma 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.



Esquema 6. Representação das regiões amplificadas para identificação das espécies de levedura. ETS (*Positions of external transcribed spacer*), SSU (*small subunit rDNA*) ou RNA ribossômico 18s, ITS (*internal transcribed spacer*) 5.8S rDNA and LSU (*large subunit rDNA*) ou RNA ribossômico 28s com o domínio D1/D2. Os números dos círculos correspondem aos *primers*: 1-SSU-F1, 2-SSU-R1, 3-ITS5, 4-ITS2, 5-ITS3, 6-ITS4, 7-NL1 e 8-NL4. (Adaptada de Arbefeville et al., 2017; Hirose et al., 2013).

4.2.3. 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 estabelecida pelo fabricante do *Kit Illustra™GFX™ PCR and Gel Band Purification* (GE Healthcare).

4.2.4. Sequenciamento e análise das sequências e homologia com banco de dados

Os fragmentos amplificados e purificados foram sequenciados na Unidade de Experimentação Animal da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro usando o sequenciador Applied Biosystems® 3500/3500xL Genetic Analyze de acordo com as instruções do fabricante. As reações foram realizadas utilizando o kit *Big-Dye Terminator* (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante. Os fragmentos de DNA foram sequenciados na direção forward.

As sequências de nucleotídeos obtidas foram submetidas a uma busca por similaridades de nucleotídeos com uso do algoritmo BLASTN no banco de dados NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). As sequências obtidas das leveduras também foram confrontadas com a sequência da levedura referenciada como uma espécie tipo (*type-strain*) ou cultura padrão (*culture from type material*) baseado na espécie de levedura com a maior similaridade encontrada no BLASTN. Ao final, a base de dados (levedura isolada do colmo de cana-de-açúcar x *type-strain*) foram alinhadas no programa MUSCLE® (Edgar, 2004) existente no

software MEGA X (Kumar et al. 2018) e exportadas para o programa de alinhamento ClustalW 2.1. (Larkin et al., 2007).

Para a região ITS, as análises filogenéticas foram executadas preliminarmente para as leveduras pertencentes ao gênero *Rhodotorula*, *Hanseniospora* e *Meyerozyma* a partir das sequências obtidas. Regiões consenso foram comparadas no banco de dados. A similaridade hipotética das leveduras isoladas foi feita com base do resultado obtido pelo alinhamento do BLASTNN. As sequências obtidas das leveduras isoladas foram adicionadas ao conjunto de sequências obtido no banco de dados e alinhadas no programa MUSCLE® (Edgar, 2004) existente no software MEGA v. 5 (Tamura et al., 2013). Espaços (Gaps) (inserções/deleções) foram tratados como inexistentes. A análise de Inferência Bayesiana (BI) empregando o método da cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) foi realizada foi utilizado para selecionar o modelo de substituição de nucleotídeos para análise de BI. Os valores de probabilidade posterior (Rannala e Yang, 1996) foram determinados da árvore consenso.

Para o domínio D1/D2 da subunidade ribossomal maior, a análise filogenética foi realizada pelo método de distância, utilizando o algoritmo *Neighbor-Joining*. Desse modo, a árvore filogenética foi obtida através da análise de *bootstrap* de 2.000 réplicas e construídas pelo MEGA v. 5 (Tamura et al., 2013).

4.3. Manutenção dos isolados

Os isolados foram conservados em meio *Sabouraud* sólido em placas de Petri, sendo suas colônias transferidas para novas placas trimestralmente, usando alças descartáveis estéreis.

Cerca de 20 ml do meio *Saboraud* sólido liquefeito foram vertidos em placas estéreis e deixadas em estufa a 30°C durante 24 horas para o controle de esterilidade do meio.

Colônias de cada um dos isolados foram então semeadas nessas placas, as quais foram mantidas novamente em estufa a 30°C para crescimento das colônias por 72 horas e só então conservadas em refrigerador a 4°C.

4.4. Análise da capacidade de solubilização de fosfato de cálcio e óxido de zinco

Para a análise da eficiência em solubilização dos nutrientes ZnO e $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ pelas leveduras isoladas de cana-de-açúcar. Elas foram cultivadas, previamente, em meio líquido YED durante 18 horas a 30°C sob agitação de 250 rpm.

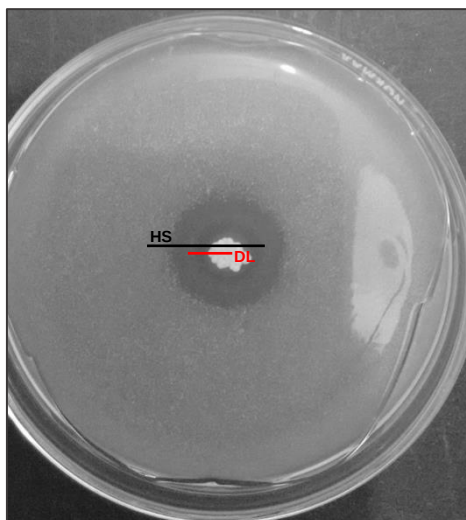
Posterior a esse crescimento ótimo, uma alíquota de 10 µl foi retirada de cada cultura de levedura e colocada adicionada em meio sólido contendo os meios específicos para análise da solubilização para os nutrientes fosfato de cálcio e óxido de zinco como descritos abaixo:

- Solubilização de fósforo (para 1 litro): 10 g Glicose, 0,5g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,2 g de NaCl, 0,1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g de KCl, 0,1 g de extrato de levedura, 0,6 g de MnSO_4 e 0,6 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – pH ajustado para 6,8 – ágar 15g – 3,0 g de fosfato tri-cálcio $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, (Adaptado de Ampraynet al., 2012 e Verma 2001);

- Solubilização de zinco (para 1 litro): 10 g Glicose, 1g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,2 de KCl, 0,1g KH_2PO_4 , 0,2g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g de extrato de levedura, 0,6 g de MnSO_4 e 0,6 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – pH ajustado para 7,0 – ágar 15g – 1 gde ZnO. (Adaptado de Rokohbaksh-Zamir al., 2011 e Saravanet al., 2003).

A capacidade de solubilizar esses nutrientes foi verificada após 7 dias de crescimento em meio sólido através da formação de um halo translúcido ao redor da colônia, que é o indicativo da solubilização do fosfato e/ou zinco.

A eficiência de solubilização (SE %) foi calculada de acordo com a fórmula: $\text{SE} = \frac{\text{Halo}}{\text{Diâmetro de crescimento da levedura}} \times 100$ (Nguyenet al., 1992; Rokohbaksh-Zamir al., 2011).



Esquema 7. Representação do cálculo da eficiência de solubilização. HS = Halo de solubilização, DL = Diâmetro de crescimento da levedura.

4.5. Análise da resistência das leveduras durante o crescimento em pH ácido e em meio contendo alumínio

Uma pequena fração das colônias de leveduras foi incubada, previamente, em tubo falcon de 3 ml contendo meio YED (1% extrato de levedura, 1% glicose, pH 6,0) líquido por 18 horas, temperatura de 30° C e agitação de 250.

Posteriormente, uma alíquota dessa cultura foi retirada, levando em consideração a densidade ótica inicial 0,01 de 600 nm (OD600) e incubada em tubo falcon de 15 ml, nas mesmas condições de crescimento. Todos os tratamentos tiveram as mesmas condições de crescimento: YED líquido, temperatura de 30° C e agitação de 250. Os tratamentos foram os seguintes: (1) Controle 1 – Meio de cultivo sem ajuste de pH; (2) Tratamento 1 – Meio de cultivo ajustado com HCl para pH 3,0; (3) Tratamento 2 – Meio de cultivo ajustado com HCl para pH 4,5; (4) Tratamento 3 – Meio de cultivo ajustado com HCl para pH 4,5 com adição $AlK(SO_4)_2$ para a concentração de 0,5 mM; (5) Tratamento 4 – Meio de cultivo ajustado com HCl para pH 4,5 com adição $AlK(SO_4)_2$ para a concentração de para a concentração de 1,0 mM.

Ao final do período de 24h de crescimento, a densidade ótica (600nm) foi analisada para cada condição acima mencionada. O monitoramento foi através do espectrofotômetro *photonics* LGS53.

4.6. Determinação da produção de compostos indólicos com especificidade para o ácido indol-3-acético

Ambas as análises, produção de compostos indólicos e ácido indol-3-acético, foram através do crescimento das leveduras em meio YED líquido, no escuro, em temperatura de 30°C, agitação de 250 rpm por 5 dias.

A produção de compostos indólicos foi detectada através do protocolo *Salkowski* como descrito a seguir.

Após 5 dias, 1 mL de cada cultura foi centrifugado (MIKRO 200R) a 3000 g por 5 minutos. 150 µL de cada sobrenadante foram adicionados em uma microplaca estéril. Posteriormente, 100 µL do reagente *Salkowski* (2% de FeCl₃ 0,5M em 35% de ácido perclórico) foi adicionada em cada poço da microplaca (Glickman e Dessaux, 1995; Gordon e Weber, 1951). Depois de 1 hora de incubação, foi detectada a produção quantitativa usando o espectrofotômetro (Plate Chameleon TM V 425-106 Multilabel Counter) em comprimento de onda de 540 nm, bem como a análise qualitativa por meio do aparecimento da cor mais rosada para as leveduras que foram capazes de produzir compostos indólicos. Uma curva de calibração com concentrações determinadas foi feita usando ácido indol-3-acético (Sigma) para quantificar a produção de compostos indólicos.

A produção de ácido indol-3-acético foi detectada através da imunotecção usando o kit Phytodetek®, Agdia Inc., ID, USA com protocolo estabelecido por Cogo et al., (2018). O teste do AIA utiliza um anticorpo monoclonal anti-AIA e é sensível na faixa de 78 - 2500 picomoles IAA / mL. O princípio do ensaio utiliza o método competitivo de ligação de anticorpos para medir as concentrações de AIA presentes nas amostras. O marcador AIA é marcado com fosfatase alcalina e depois adicionado junto às amostras em micropoços revestidos com anticorpo. Uma reação de ligação competitiva é estabelecida entre uma quantidade constante do marcador AIA, uma quantidade limitada do anticorpo e a amostra contendo AIA metilado. A cor amarela produzida é inversamente proporcional à quantidade de AIA na amostra. A intensidade da cor está relacionada à concentração de AIA da amostra por meio de uma curva padrão.

4.7. Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com auxílio do software SISVAR 5.6 (Ferreira, 2014) utilizando o teste de Scott-Knott (Scott e Knott, 1974) em 5% de probabilidade.

Os dados para análise do crescimento das leveduras isoladas sob condições diferentes de pH ($n=3$) e concentrações de alumínio ($n=3$), e a produção de compostos indólicos ($n=4$) são apresentados como médias $\pm$ erro padrão. Todos os pressupostos da análise de variância foram verificados para garantir a validade da análise estatística.

5. RESULTADOS

5.1. Identificação das leveduras isoladas de colmo de cana-de-açúcar

As vinte leveduras isoladas do colmo cana-de-açúcar *Saccharum spp.* foram identificadas por meio dos marcadores moleculares utilizados em sequenciamento com a região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) e do domínio D1/D2 da subunidade maior do RNA ribossômico (LSU/28S).

O produto de amplificação por PCR do DNA genômico em gel de agarose a 1,5% das leveduras isoladas usando os primers ITS1 e ITS4 para amplificação da região ITS (figura 1A) e os primers NL1 e NL4 para a amplificação da região D1/D2 (figura 1B) são mostrados. O produto amplificado de ambas as regiões gerou fragmento de aproximadamente 500 - 600 pb para todos os isolados. Destoando a levedura SPC1 com 356 pb e as leveduras RBH1 e RBH2 com 710 pb.

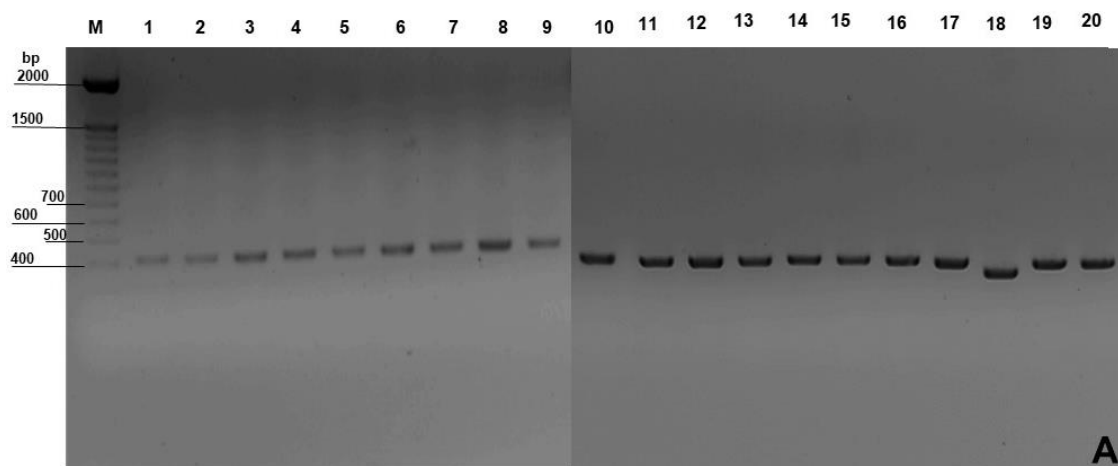
O código das leveduras foi criado levando em consideração as variedades de cana-de-açúcar de onde foram isoladas as leveduras: “CB” refere-se a variedade CB56-155, “SP” a SP80-328 e “RB” a RB86-7515, e seguido da primeira letra do gênero identificado da leveduras: “C” refere-se a *Candida*, “H” a *Hanseniaspora*, “M” a *Meyerozyma* e “R” a *Rhodotrula*. Portanto, as sequências nucleotídicas obtidas na análise molecular quando confrontadas com banco de dados BLASTN/NCBI caracterizaram 4 gêneros diferentes: 3 leveduras pertencentes a *Candida* sp. – SPC1, RBC2 e RBC3; 2 leveduras pertencentes a

Hanseniaspora sp. – RBH1 e RBH2; 10 leveduras pertencentes a *Meyerozyma* sp. – CBM1, SPM2, SPM3, SPM4, CBM5, CBM6, CBM7, CBM8, SPM9 e SPM10; 5 leveduras pertencentes a *Rhodotorula* sp. – RBR1, CBR2, RBR3, SPR4 e RBR5. Para o gene ITS, todas as vinte leveduras foram sequenciadas. Entretanto, para o gene D1/D2, duas das leveduras isoladas (RBC3 e CBM6) não foram sequenciadas porque as sequências não apresentaram produto de sequenciamento com boa resolução e, portanto, foram excluídas da análise para esse marcador. As sequências que apresentaram $\geq 97\%$ de Identidade com e-value igual a zero ou o mais próximo foram selecionadas. Dessa forma, analisou-se as vinte leveduras isoladas do colmo de cana-de-açúcar (Tabela 1). O sequenciamento da região ITS foi incerto para identificação da maioria das espécies, pois nenhuma espécie foi 100% similar às sequências depositadas no banco de dados. Ao passo que para o sequenciamento da região D1/D2, cinco leveduras apresentaram similaridade de 100% com relação às sequências depositadas no banco de dados: RBC2 (identificada como *C. parapsilosis*), CBM5, CBM7 e SPM10 (ambas identificadas como *M. caribbica*), RBR1 (identificada como *R. mucilaginosa*).

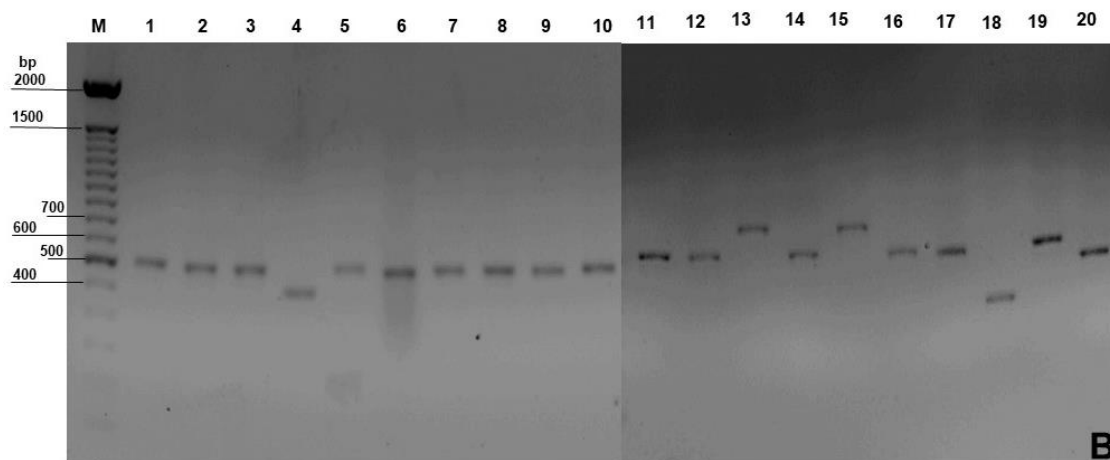
Especificamente para a região ITS, as sequências nucleotídicas na análise molecular quando confrontadas com banco de dados BLAST/NCBI caracterizaram as 20 leveduras como sendo espécies: *Candida dosseyi* (código SPC1), *Candida parapsilosis* (código RBC2 e RBC3), *Hanseniaspora vineae* (código RBH1 e RBH2), *Meyerozyma carpophila* (código CBM1, SPM2, SPM3, SPM4, CBM5, CBM7, SPM9 e SPM10), *Meyerozyma guilliermondii* (código CBM6 e CBM8) e *Rhodotorula mucilaginosa* (código RBR1, CBR2, RBR3, SPR4 e RBR5).

Especificamente para a região D1/D2, as sequências nucleotídicas na análise molecular quando confrontadas com banco de dados BLAST/NCBI caracterizaram as 20 leveduras como sendo espécies: *Candida dosseyi* (código SPC1), *Candida parapsilosis* (código RBC2 e RBC3), *Hanseniaspora vineae* (código RBH1 e RBH2), *Meyerozyma caribbica* (código CBM5, CBM7 e SPM10), *Meyerozyma guilliermondii* (código CBM1, SPM2, SPM3, SPM4, CBM8 e SPM9) e *Rhodotorula mucilaginosa* (código RBR1, CBR2, RBR3, SPR4 e RBR5). Todas as leveduras pertencentes ao gênero *Candida*, *Hanseniaspora* e *Rhodotorula* também foram mais similares com as mesmas espécies do alinhamento de região

ITS. Enquanto que o gênero *Meyerozyma* houve divergência nas análises para região ITS e D1/D2.



1 – SPR4 581 pb / 2 – SPM3 579 pb / 3 – SPM4 581 pb / 4 – RBC2 482 pb / 5 – RBR3 584 pb / 6 – CBM7 581 pb / 7 – CBM1 582 pb / 8 – CBM8 582 pb / 9 – CBM5 582 pb / 10 – RBR1 580 pb / 11 – SPM9 582 pb / 12 – SPM10 582 pb / 13 – RBH1 581 pb / 14 – CBM6 (não sequenciada) / 15 – CBR2 584 pb / 16 – RBR5 585 pb / 17 – SPM2 581 pb / 18 – SPC1 530 pb / 19 – RBH2 586 pb / 20 – RBC3 (não sequenciada).



1 – SPR4 582 pb / 2 – SPM3 574 pb / 3 – SPM4 574 pb / 4 – RBC2 488 pb / 5 – RBR3 580 pb / 6 – CBM7 575 pb / 7 – CBM1 573 pb / 8 – CBM8 574 pb / 9 – CBM5 573 pb / 10 – RBR1 581 pb / 11 – SPM9 574 pb / 12 – SPM10 574 pb / 13 – RBH1 711 pb / 14 – CBM6 576 pb / 15 – CBR2 583 pb / 16 – RBR5 581 pb / 17 – SPM2 574 pb / 18 – SPC1 356 pb / 19 – RBH2 710 pb / 20 – RBC3 486 pb.

Figura 1. DNA genômico extraído das leveduras isoladas de cana-de-açúcar. Eletroforese em gel de agarose 1,5 % dos fragmentos de amplificação da PCR. M – Marcador molecular 100 pb DNA Ladder Invitrogen. (A) Produtos dos iniciadores NL1-NL4 para amplificação da região D1/D2 e (B) Produtos dos iniciadores ITS1 e ITS4 para amplificação da região ITS (Internal Transcribed Spacer). *Candida* sp. (SPC1, RBC2 e RBC3), *Hanseniaspora* sp. (RBH1 e RBH2), *Meyerozyma* sp. (CBM1, SPM2, SPM3, SPM4, CBM5, CBM6, CBM7, CBM8, SPM9 e SPM10) e *Rhodotrula* sp. (RBR1, CBR2, RBR3, SPR4 e RBR5).

Tabela 1. Identificação das leveduras isoladas do colmo cana-de-açúcar *Saccharum spp.* com os marcadores moleculares da subunidade RNA ribossômico

Gênero ^a	Isolado ^a	Origem ^b	Região ITS ^c			Região D1/D2 ^d		
			Espécie	Número de Acesso	E-value / Identidade	Espécie	Número de Acesso	E-value / Identidade
<i>Candida</i>	SPC1	SP80-3280	<i>Candida dosseyi</i>	NR_111406.1	8e-177 / 98	<i>Candida dosseyi</i>	NG_055374.1	0 / 99
	RBC2	RB86-7515	<i>Candida parapsilosis</i>	NR_130673.1	0 / 99	<i>Candida parapsilosis</i>	NG_054833.1	0 / 100
	RBC3	RB86-7515	<i>Candida parapsilosis</i>	NR_130673.1	0 / 99	ND	—	—
<i>Hanseniaspora</i>	RBH1	RB86-7515	<i>Hanseniaspora vineae</i>	NR_165975.1	0 / 97	<i>Hanseniaspora vineae</i>	NG_055415.1	0 / 99
	RBH2	RB86-7515	<i>Hanseniaspora vineae</i>	NR_165975.1	0 / 99	<i>Hanseniaspora vineae</i>	NG_055415.1	0 / 99

^a Coleção de leveduras isoladas do colmo de cana-de-açúcar, em Campos dos Goytacazes/RJ.

^b Variedade de cana-de-açúcar *Saccharum spp.*;

^c Espécie, número de acesso, e-value e identidade (%) das sequências alinhadas por meio do BLASTN/NCBI para região ITS (internal transcribed spacer).

^d Espécie, número de acesso, e-value e identidade (%) das sequências alinhadas por meio do BLASTN/NCBI para região 28S/LSU (large subunit) que contém o domínio D1/D2.

ND – sequência não determinada porque **não** apresentaram produto de amplificação.

Tabela 1. Continuação

Gênero ^a	Isolado ^a	Origem ^b	Região ITS ^c			Região D1/D2 ^d		
			Espécie	Número de Acesso	E-value / Identidade	Espécie	Número de Acesso	E-value / Identidade
<i>Meyerozyma</i>	CBM1	CB56-155	<i>Meyerozyma carpophila</i>	NR_152984.1	0 / 99	<i>Meyerozyma guilliermondi</i>	NG_042640.1	0 / 98
	SPM2	SP80-3280	<i>Meyerozyma carpophila</i>	NR_152984.1	0 / 99	<i>Meyerozyma guilliermondi</i>	NG_042640.1	0 / 98
	SPM3	SP80-3280	<i>Meyerozyma carpophila</i>	NR_152984.1	0 / 99	<i>Meyerozyma guilliermondi</i>	NG_042640.1	0 / 98
	SPM4	SP80-3280	<i>Meyerozyma carpophila</i>	NR_152984.1	0 / 99	<i>Meyerozyma guilliermondi</i>	NG_042640.1	0 / 98
	CBM5	CB56-155	<i>Meyerozyma carpophila</i>	NR_152984.1	0 / 99	<i>Meyerozyma caribbica</i>	NG_054806.1	0 / 100

^a Coleção de leveduras isoladas do colmo de cana-de-açúcar, em Campos dos Goytacazes/RJ.

^b Variedade de cana-de-açúcar *Saccharum* spp.;

^c Espécie, número de acesso, e-value e identidade (%) das sequências alinhadas por meio do BLASTN/NCBI para região ITS (internal transcribed spacer).

^d Espécie, número de acesso, e-value e identidade (%) das sequências alinhadas por meio do BLASTN/NCBI para região 28s/LSU (large subunit) que contém o domínio D1/D2.

Tabela 1. Continuação

Gênero ^a	Isolado ^a	Origem ^b	Região ITS ^c			Região D1/D2 ^d		
			Espécie	Número de Acesso	E-value / Identidade	Espécie	Número de Acesso	E-value / Identidade
<i>Meyerozyma</i>	CBM6	CB56-155	<i>Meyerozyma guilliermondi</i>	NR_111247.1	0 / 98	ND	—	—
	CBM7	CB56-155	<i>Meyerozyma carpophila</i>	NR_152984.1	0 / 99	<i>Meyerozyma caribbica</i>	NG_054806.1	0 / 100
	CBM8	CB56-155	<i>Meyerozyma guilliermondi</i>	NR_111247.1	0 / 99	<i>Meyerozyma guilliermondi</i>	NG_042640.1	0 / 99
	SPM9	SP80-3280	<i>Meyerozyma carpophila</i>	NR_152984.1	0 / 99	<i>Meyerozyma guilliermondi</i>	NG_042640.1	0 / 98
	SPM10	SP80-3280	<i>Meyerozyma carpophila</i>	NR_152984.1	0 / 99	<i>Meyerozyma caribbica</i>	NG_054806.1	0 / 100

^a Coleção de leveduras isoladas do colmo de cana-de-açúcar, em Campos dos Goytacazes/RJ.

^b Variedade de cana-de-açúcar *Saccharum* spp.;

^c Espécie, número de acesso, e-value e identidade (%) das sequências alinhadas por meio do BLASTN/NCBI para região ITS (internal transcribed spacer).

^d Espécie, número de acesso, e-value e identidade (%) das sequências alinhadas por meio do BLASTN/NCBI para região 28S/LSU (large subunit) que contém o domínio D1/D2.

ND – sequência não determinada porque **não** apresentaram produto de amplificação.

Tabela 1. Continuação

Gênero ^a	Isolado ^a	Origem ^b	Região ITS ^c			Região D1/D2 ^d		
			Espécie	Número de Acesso	E-value / Identidade	Espécie	Número de Acesso	E-value / Identidade
<i>Rhodotorula</i>	RBR1	RB86-7515	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	NR_073296.1	0 / 99	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	NG_055716.1	0 / 100
	CBR2	CB56-155	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	NR_073296.1	0 / 99	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	NG_055716.1	0 / 99
	RBR3	RB86-7515	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	NR_073296.1	0 / 99	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	NG_055716.1	0 / 99
	SPR4	SP80-3280	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	NR_073296.1	0 / 98	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	NG_055716.1	0 / 99
	RBR5	RB86-7515	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	NR_073296.1	0 / 98	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	NG_055716.1	0 / 99

^a Coleção de leveduras isoladas do colmo de cana-de-açúcar, em Campos dos Goytacazes/RJ.

^b Variedade de cana-de-açúcar Saccharum spp.;

^c Espécie, número de acesso, e-value e identidade (%) das sequências alinhadas por meio do BLASTN/NCBI para região ITS (internal transcribed spacer).

^d Espécie, número de acesso, e-value e identidade (%) das sequências alinhadas por meio do BLASTN/NCBI para região 28S/LSU (large subunit) que contém o domínio D1/D2.

5.2. Solubilização dos nutrientes fósforo e zinco

Os resultados da tabela 2 são referentes aos experimentos para determinar a solubilização de fósforo (P) e zinco (Zn) pelas leveduras isoladas do colmo de cana-de-açúcar. A eficiência de solubilização (SE%) de P e Zn, segundo a metodologia descrita por Nguyen et al., 1992 e Rokohbaksh-Zamin et al., 2011, foi calculada. A comparação entre as leveduras pertencentes à mesma espécie em escala crescente de solubilização desses nutrientes foi elaborada.

A maioria das leveduras pôde ser descrita como micro-organismos solubilizadores de P (MSF) e micro-organismos solubilizadores de Zn (MSZ). Todas as leveduras das espécies de *Meyerozyma* sp. – CBM1, SPM2, SPM3, SPM4, CBM5, CBM6, CBM7, CBM8, SPM9 e SPM10 – foram capazes de solubilizar ambos os nutrientes. As duas leveduras da espécie *Hanseniospora* sp. – RBH1 e RBH2 não foram capazes de solubilizar o P adicionado ao meio de cultivo e o meio de cultivo para determinação da solubilização de Zn mostrou-se prejudicial ao crescimento dessas duas leveduras, por isso não foi possível determinar a solubilização de Zn. Dentre as leveduras pertencentes a *Rhodotorula* sp., a levedura RBR1 não solubilizou nenhum dos nutrientes, a levedura RBR3 foi a única capaz de solubilizar o Zn adicionado ao meio de cultivo e as leveduras CBR2, SPR4 e SPR5 só solubilizaram o P adicionado ao meio de cultivo.

A levedura da espécie *Candida* sp. – RBC3 (633%) foi a levedura que mais solubilizou o P. Enquanto que as leveduras da espécie de *Meyerozyma* sp. – SPM9 (468%) e SPM10 (400%) foram as que mais solubilizaram Zn em comparação com as demais leveduras isoladas do colmo de cana-de-açúcar.

Levando em consideração a importância comercial das variedades de cana-de-açúcar, as leveduras *Meyerozyma* sp. – SPM10 e *Candida* sp. – RBC3 isoladas respectivamente da variedade SP80-3280 e RB86-7515 seriam promissoras em estudos futuros em casa de vegetação a fim de analisar as respostas das mesmas em interação simbiótica com plantas.

Tabela 2. Eficiência de solubilização de fósforo e zinco pelas leveduras isoladas de colmo de cana-de-açúcar.

Código	Gênero das leveduras	ES P (%)*	ES Zn (%)*
SPC1	<i>Candida sp.</i>	133	285
RBC2		210	423
RBC3		633	403
RBH1	<i>Hanseniospora sp.</i>	-	ND
RBH2		-	ND
CBM1	<i>Meyerozyma sp.</i>	246	360
SPM2		300	186
SPM3		225	330
SPM4		212	300
CBM5		195	304
CBM6		215	301
CBM7		211	295
CBM8		212	373
SPM9		243	468
SPM10		322	400
RBR1	<i>Rhodotorula sp.</i>	-	-
CBR2		311	-
RBR3		-	210
SPR4		163	-
RBR5		269	-

*Eficiência de Solubilização (ES%) de fósforo (P) e de Zinco (Zn) = (Halo Transluzido de Solubilização/Diâmetro das Colônias) x 100 (Nguyen et al., 1992 e RokohbakshZamin et al., 2011).

- : não solubilizado.

ND: Não determinado.

Os dados são representativos das médias de dois experimentos (n=2) executados nas mesmas condições de cultivo e em dias diferentes.

Escala demonstrativa em ordem crescente de solubilização de P e Zn entre as leveduras isoladas

Solubilização de Fósforo

Candida sp.

RBC3 > RBC2 > SPC1

Meyerozyma sp.

SPM10 > SPM2 > CBM1 > SPM9 >
SPM3 > CBM6 > SPM4 / CBM8 >
CBM7 > CBM5

Rhodotorula sp.

CBR2 > RBR5 > SPR4

Solubilização de Zinco

Candida sp.

RBC3 > RBC2 > SPC1

Meyerozyma sp.

SPM9 > SPM10 > CBM8 > CBM1 >
SPM3 > SPM4 > CBM5 > CBM6 >
CBM7 > SPM2

5.3. Análise da resistência das leveduras isoladas do colmo de cana-de-açúcar a diferentes pHs

O resultado obtido na figura 3 é referente ao experimento que as leveduras isoladas do colmo de cana-de-açúcar foram crescidas em meio de cultivo com diferentes pHs: 3,0, 4,5 e 6,0. Foi possível concluir que todas as leveduras podem ser consideradas ácido-resistentes, pois elas cresceram satisfatoriamente em todas as condições de pH.

Em relação à média de crescimento das leveduras nos pHs avaliados, de acordo com o critério de agrupamento de *Scott-Knott*, em nível de 5% de probabilidade, pH 4,5 apresentou a maior média de crescimento.

Quando analisadas as diferenças do crescimento das leveduras na mesma condição de cultivo, observa-se que: (i) o crescimento de todas as leveduras, no pH 6,0, não se diferenciou significativamente, apesar da notável diferença quantitativa de crescimento entre a levedura RBC3 (*Candida* sp.) com o menor crescimento (7,43) e a levedura SPM10 (*Meyerozyma* sp.) com o maior crescimento (23,0); (ii) no cultivo com pH 4,5, as leveduras *Rhodotorula* sp. – RBR3 (31,1), SPR4 (29,9), SPR5 (29,9) e RBR1 (25,9), *Candida* sp. – RBC2 (25,9) e da espécie *Meyerozyma* sp. – SPM9 (25,6) e CBM7 (23,0) cresceram mais significativamente do que com as demais leveduras, mesmo quando analisadas as leveduras dentro de um mesmo gênero; (iii) as leveduras da espécie *Meyerozyma* sp. – SPM10 (42,3) e CBM6 (40,0) e da espécie *Rhodotorula* sp. – SPR4 (26,5) foram as que tiveram o crescimento mais significativo no cultivo com pH 3,0 seguido das espécies *Candida* sp. – SPC1 (24,6) e *Meyerozyma* sp. – CBM7 (24,0). Confrontado com as demais leveduras, a levedura RBC3 da espécie *Candida* sp. apresentou um crescimento reduzido quando crescida nos diferentes pHs do meio de cultivo, porém não houve diferença significativa entre os tratamentos analisados, assumindo que essa levedura tem um crescimento ínfimo.

Quando analisada a diferença entre as condições de cultivo para cada levedura individual, observa-se que: (i) as leveduras CBM6 (40,6) e SPM10 (42,3) da espécie *Meyerozyma* sp. cresceram mais no pH 3,0 do que quando cultivadas em pH 4,5 e 6,0, e o crescimento nesses dois pHs foi equiparado; (ii) as leveduras RBR3 (30,1) e SPR5 (29,9) da espécie *Rhodotorula* sp. e RBC3 (25,9) da espécie

Candida sp. obtiveram maior crescimento quando cultivadas no pH 4,5 do que quando cultivadas em pH 3,0 e 6,0, e o crescimento nesses pHs foi equiparado; (iii) a levedura SPR4 da espécie *Rhodotorula* sp. teve o crescimento maior no pH 3,0 (26,5) e 4,5 (29,9) do que no pH 6,0 (16,2); (iv) a levedura CBM1 da espécie *Meyerozyma* sp. foi a única que teve o crescimento inibido pelo pH 3,0 (7,1), porém não houve diferença estatisticamente significativa no cultivo de pH 4,5 (15,4) e 6,0 (16,9). As demais leveduras não citadas separadamente (RBC3, RBH1, RBH2, SPM2, SPM3, SPM4, CBM5, CBM7, CBM8, SPM9, RBR1 e CBR2) não revelaram diferenças estatisticamente significativas durante o crescimento nos três diferentes pHs do meio de cultivo, mesmo que o crescimento seja quantitativamente distinto. Como exemplo, as leveduras SPM2: pH 3,0 (8,4), pH 4,5 (17,7) e pH 6,0 (18,8) e SPM9: pH 3,0 (15,0), pH 4,5 (25,0) e pH 6,0 (19,2) pertencentes à espécie *Meyerozyma* sp.

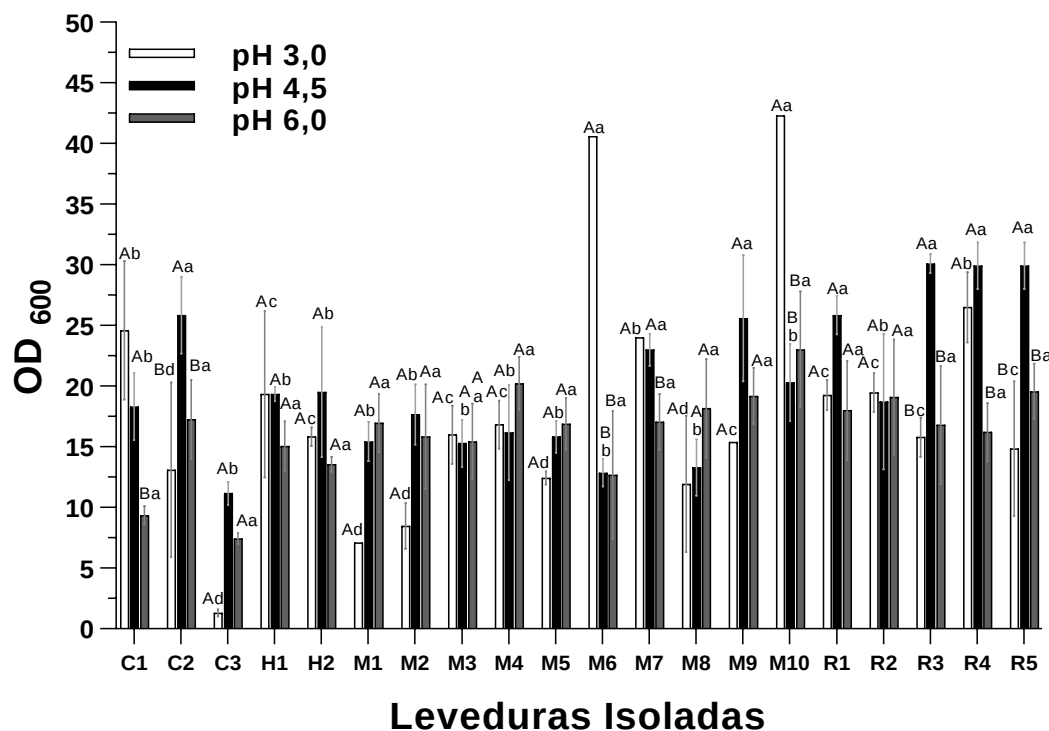


Figura 2. Crescimento *in vitro* das leveduras isoladas do colmo de cana-de-açúcar em diferentes condições de pH. As leveduras foram crescidas em meio de cultivo YED, a 30°C e sob agitação de 250 rpm. O crescimento das leveduras foi calculado pela OD₆₀₀ após 24 horas. O tratamento com pH 6,0 é considerado o controle, pois é o próprio pH do meio de cultivo sem ajuste. Os tratamentos com pH 4,5 e 3,0 foram alcançados pelo ajuste do meio de cultivo com HCl. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o software SISVAR 5.6. Os dados são médias (n=3) ± desvio padrão. As letras minúsculas são diferenças entre o crescimento das leveduras no mesmo tratamento e as letras maiúsculas são as diferenças entre os tratamentos para cada levedura, de acordo com o critério de agrupamento de Scott-Knott (1974), em 5% de probabilidade.

5.4. Análise da resistência das leveduras isoladas do colmo de cana-de-açúcar a diferentes concentrações de alumínio

O resultado obtido na Figura 4 é referente ao experimento que as leveduras isoladas do colmo de cana-de-açúcar foram cultivadas por 24 horas em meio de cultura com pH 4,5 na presença e na ausência de alumínio (AlK(SO₄)₂). Foi possível concluir que todas as leveduras podem ser consideradas alumínio-resistentes, pois elas cresceram na presença das concentrações de alumínio testadas: 0,5 e 1,0 mM.

Em relação à média de crescimento das leveduras, de acordo com o critério de agrupamento de *Scott-Knott*, em nível de 5% de probabilidade, não houve diferença estatisticamente significativa no crescimento das leveduras nos meios que continham alumínio e no meio sem o alumínio (condição controle).

Quando analisadas as diferenças do crescimento das leveduras na mesma condição de cultivo (sem $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ ou 0,5 mM de $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ ou 1,0 mM de $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$), observa-se que: (i) na condição controle, sem adição de alumínio no meio, as leveduras *Rhodotorula* sp. – RBR3 (31,1), SPR4 (29,9), SPR5 (29,9) e RBR1 (25,9), a *Candida* sp. – RBC2 (25,9) e as *Meyerozyma* sp. – SPM9 (25,6) e CBM7 (23,0) foram as que cresceram mais significativamente do que as demais leveduras, mesmo que as demais do mesmo gênero; (ii) no cultivo com 0,5 mM de $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$, as leveduras *Meyerozyma* sp. – CBM8 (22,8), CBM6 (21,8), CBM1 (21,5), SPM2 (21,2), SPM3 (21,1), CBM7 (20,8) e SPM10 (20,7), todas as leveduras *Rhodotorula* sp. – SPR5 (30,3), CBR2 (28,8), RBR1 (23,3), SPR4 (22,3) e RBR3 (22,8) e a *Candida* sp. – RBC2 (26,3) foram as que tiveram o crescimento mais significativo; (iii) no cultivo com 1,0 mM de $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$, as leveduras *Meyerozyma* sp. – SPM10 (27,4), CBM8 (22,2), CBM1 (25,5), SPM2 (24,7) e CBM6 (22,1), as *Rhodotorula* sp. – SPR4 (25,7), RBR3 (25,5) e CBR2 (24,6) e a *Candida* sp. – RBC2 (30,5) foram as que tiveram o crescimento mais significativo.

Quando analisada a diferença entre as condições de cultivo para cada levedura individual, observa-se que: (i) apesar de algumas leveduras apresentarem uma certa tendência de aumento de crescimento na presença das concentrações de alumínio (tabela 3), apenas a levedura CBM8 da espécie *Meyerozyma* sp. na presença de 0,5 mM (22,3) e 1,0 mM (22,8) de $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ cresceu significativamente mais do que na ausência de alumínio (13,3) (figura 4); (ii) apesar das leveduras CBM1, SPM3 e CBM6 pertencentes a *Meyerozyma* sp., e da levedura CBR2 pertencente a *Rhodotorula* sp. também crescerem quantitativamente maior na presença das duas concentrações de alumínio (tabela 3), a diferença do crescimento não foi estatisticamente significativa entre as três condições (figura 4); (iii) o crescimento da levedura SPR5 (*Rhodotorula* sp.) na concentração de 1,0 mM de $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ (20,6) foi significativamente menor (figura 3) com inibição de 31% do crescimento (tabela 3), porém a concentração de 0,5 mM de $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ (30,3) não interferiu no crescimento da levedura da espécie comparado com a condição controle (29,9); (iv) apesar da levedura SPM9

(*Meyerozyma* sp.) ter crescido quantitativamente menos na presença de alumínio 0,5 mM (15,3) e 1,0 mM (25,6) (figura 4 e tabela 3), não foi significativa comparado ao controle (25,6). As demais leveduras que não foram citadas separadamente (SPC1, RBC2, RBC3, RBH1, RBH2, SPM2, SPM4, CBM5, CBM6, CBM7, SPM10, RBR1, RBR3 e SPR4) também não revelaram diferenças estatisticamente significativas no crescimento com ou sem a adição de alumínio no meio de cultivo (figura 4), mesmo quando as porcentagens do crescimento sugerem sinal de estimulação ou inibição do crescimento pela concentração de alumínio (tabela 3).

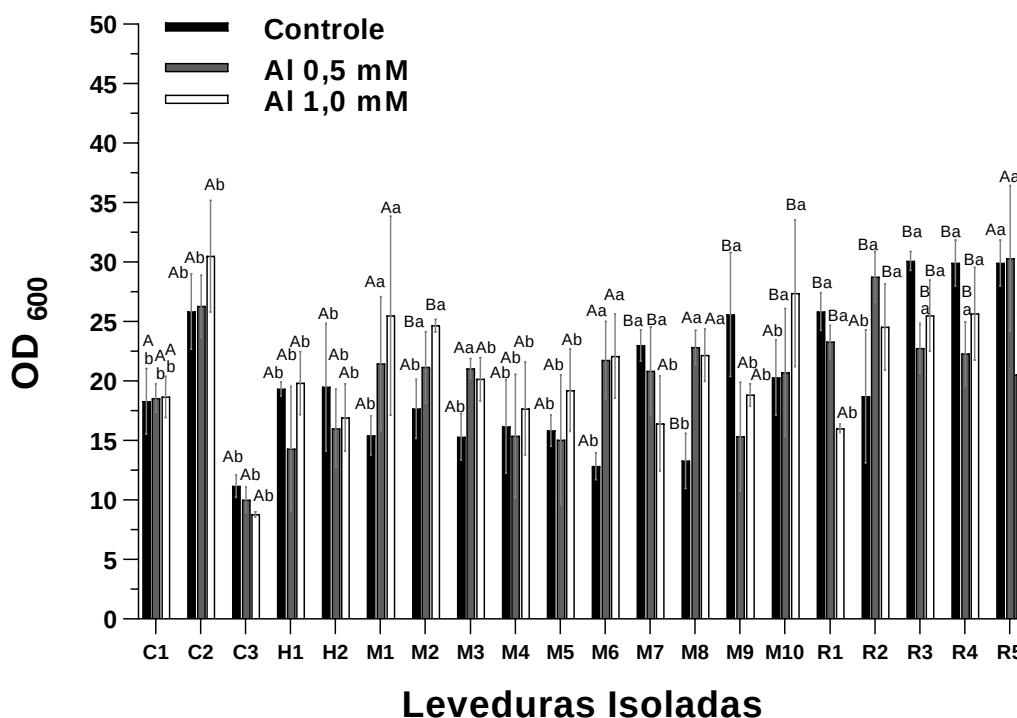


Figura 3. Resposta do crescimento das leveduras isoladas do colmo de cana-de-açúcar sob estresse do metal pesado alumínio. As leveduras foram crescidas, em meio de cultivo YED, pH 4,5 ajustado com HCl, a 30°C e sob agitação de 250 rpm. O crescimento das leveduras foi calculado pela OD₆₀₀ após 24 horas. Meios de cultivo foram suplementados com concentrações finais de 0,5 mM e 1,0 mM de alumínio (AlK(SO₄)₂). A condição de cultivo controle foi aquela sem suplementação de alumínio. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o software SISVAR 5.6. Os dados são médias (n=3) ± desvio padrão. As letras minúsculas são diferenças entre o crescimento das leveduras no mesmo tratamento e as letras maiúsculas são as diferenças entre os tratamentos para cada levedura, de acordo com o critério de agrupamento de Scott-Knott (1974), em 5% de probabilidade.

Tabela 3. Porcentagem de crescimento* das leveduras isoladas do colmo de cana-de-açúcar quando cultivadas na presença de alumínio ($\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$)

Leveduras Isoladas	Crescimento em 0,5 mM Al	Crescimento em 1,0 mM Al
SPC1	1	2
RBC2	2	18 ^s
RBC3	10 ⁱ	21 ⁱ
RBH1	26 ⁱ	2
RBH2	18 ⁱ	13 ⁱ
CBM1	39 ^s	65 ^s
SPM2	20 ^s	40 ^s
SPM3	38 ^s	32 ^s
SPM4	5	9 ^s
CBM5	5	21 ^s
CBM6	69 ^s	72 ^s
CBM7	9 ⁱ	29 ⁱ
CBM8	72 ^s	67 ^s
SPM9	33 ⁱ	18 ⁱ
SPM10	2	35 ^s
RBR1	10 ⁱ	38 ⁱ
CBR2	54 ^s	31 ^s
RBR3	24 ⁱ	15 ⁱ
SPR4	26 ⁱ	14 ⁱ
SPR5	1	31 ⁱ

*A porcentagem (%) de crescimento foi relativa ao tratamento controle, o qual não teve suplementação, no meio de cultivo, de concentrações $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$. Para os devidos fins dos cálculos o crescimento após 24 horas do tratamento controle foi considerado 100% do crescimento ótimo, separadamente em cada levedura crescida.

ⁱ – refere-se à porcentagem de crescimento inferior ao tratamento controle.

^s – refere-se à porcentagem de crescimento superior ao tratamento controle.

5.5. Determinação da produção de compostos indólicos com especificidade para o ácido indol-3-acético (AIA) pelas leveduras isoladas de colmo de cana-de-açúcar

Os dados representados na figura 4 são referentes à determinação *in vitro* da produção de compostos indólicos (figura 4A) revelados pelo reagente de *Salkowski* e de ácido indol-3-acético (AIA) revelados por imunodeteção.

As médias de produção de compostos indólicos, de acordo com o critério de agrupamento de *Scott-Knott*, em nível de 5% de probabilidade, foram semelhantes para todas as leveduras, ou seja, não há nenhuma levedura que se destacou.

No entanto, quantitativamente, a concentração de compostos indólicos variou de 9,9 µg/mL produzido pela levedura SPR4 e SPR5 (ambas *Rhodotorula* sp.) e a 38,9 µg/mL e 36,8 µg/mL, produzido, respectivamente, pelas leveduras RBR1 (*Rhodotorula* sp.) e SPM10 (*Meyerozyma* sp.), seguido da levedura SPC1 (27,2 µg/mL, *Candida* sp.).

Interessantemente, apesar da levedura RBR1 ter produzido grande quantidade de compostos indólicos, não se detectou a produção de AIA por imunodeteção. Fato que também ocorreu com as leveduras da espécie RBC2 (*Candida* sp.), as SPM3, CBM5, CBM6, CBM8 e SPM9 (todas *Meyerozyma* sp.) e as CBR2 e RBR3 (ambas *Rhodotorula* sp.).

A levedura SPR4 (*Rhodotorula* sp.) destacou-se quantitativamente com a maior produção de AIA (806,49 pM/mL), porém é a levedura que menos detectou-se compostos indólicos totais (9,9 µg/mL).

Apesar de o experimento que analisou a produção específica de AIA por imunodeteção ser único, ele é altamente sensível e capaz de indicar que nem todas as leveduras isoladas são capazes de produzir AIA, mesmo quando houve a detecção de compostos indólicos.

Levando em consideração a importância comercial das variedades de cana-de-açúcar, as leveduras SPM4 (AIA 659,4 pM/mL) e SPM10 (AIA 340,2 pM/mL) do gênero *Meyerozyma*, isoladas, respectivamente da variedade SP80-3280, e a levedura SPR4 (806,5 pM/mL) do gênero *Rhodotorula*, isolada RB86-7515, seriam promissoras em estudos futuros em casa de vegetação a fim de analisar as respostas à produção de compostos indólicos e/ou AIA pelas leveduras durante interação simbiótica com plantas.

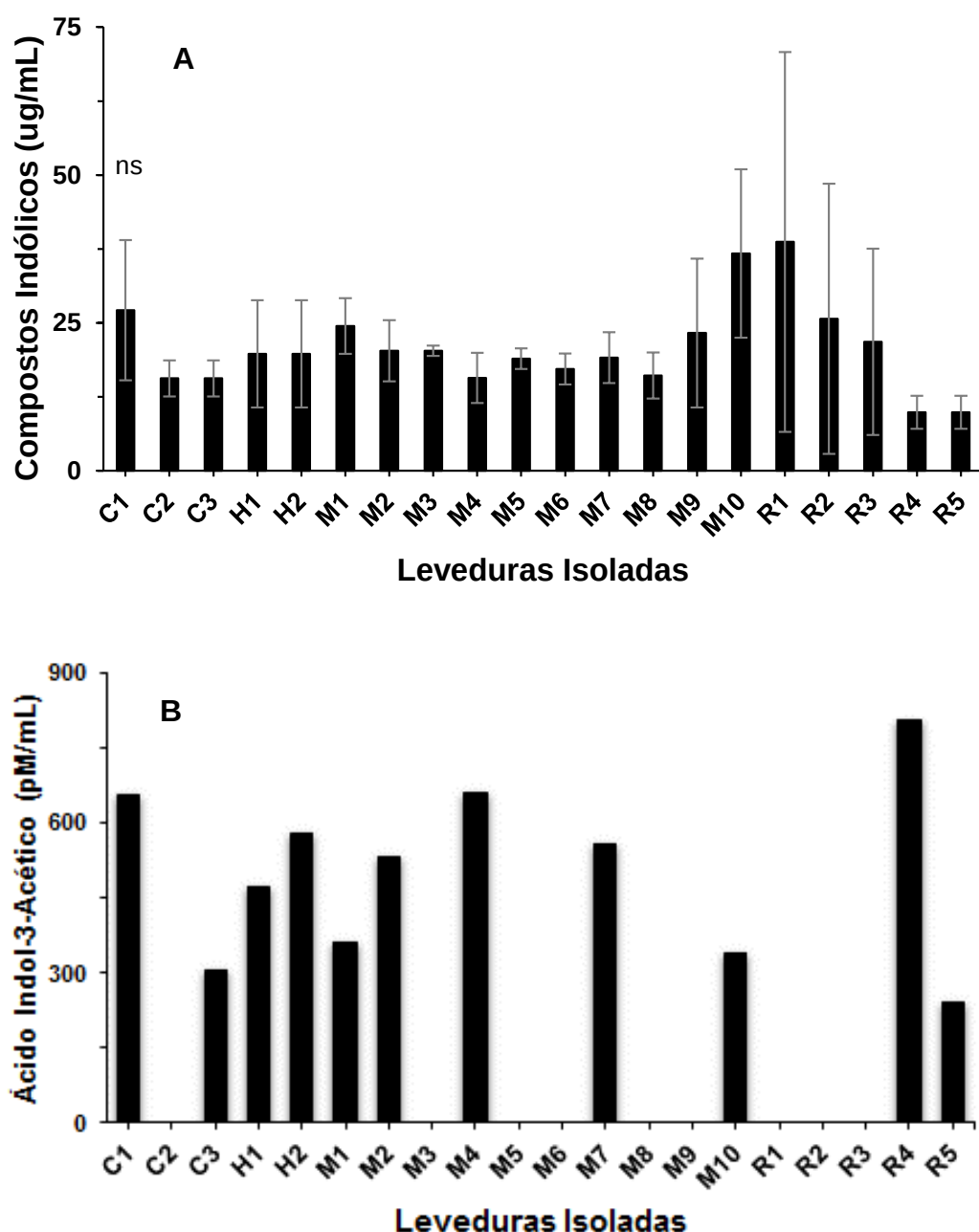


Figura 4. Determinação da produção de compostos indólicos com especificidade para o ácido indol-3-acético (AIA). As leveduras foram crescidas, em meio de cultivo YED, a 30°C, no escuro, sob agitação de 250 rpm durante 5 dias. Posteriormente, as culturas foram submetidas à centrifugação a uma rotação de 3000g por 5 minutos para obtenção do sobrenadante contendo apenas o de cultivo que foi utilizado para determinação de composto indólicos pelo método colorimétrico do reagente de *Salkowski*, calculado a uma densidade óptica de 450 nm e determinação de ácido indol-3-acético (AIA) através da imunodeteção utilizando o Phytodetec® IAA. Na figura 4A, os dados são as médias (n=3) $\pm$ desvio padrão, submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o software SISVAR 5.6, de acordo com o critério de agrupamento de Scott-Knott (1974) em 5% de probabilidade; ns – não significativo. Na figura 4B, o experimento é único representativo.

6. DISCUSSÃO

Os micro-organismos extensivamente associam-se com plantas, constituindo uma microbiota vegetal (Orozco-Mosqueda et al., 2018). Eles vivem, prosperam e interagem com os tecidos vegetais – raízes, brotos, folhas, flores e sementes – influenciando positivamente as funções de diferentes órgãos (Haney e Ausubel, 2015; Mendes et al., 2013; Mueller e Sachs, 2015; Berg et al., 2016; Nelson, 2017; Turner et al., 2013). Praticamente, todos os tecidos de uma planta hospedam comunidades microbianas, podendo ser na rizosfera, na filosfera (superfícies aéreas das plantas) e na endosfera (tecidos internos) (Turner et al., 2013; de Souza et al., 2015; Vorholt et al., 2012).

A cana-de-açúcar tem sido objeto de estudos há várias décadas. No Brasil, a cana-de-açúcar chegou logo após o descobrimento do País (Marin e Nassif, 2013), adaptou-se às condições brasileiras, tornando-se uma cultura de importância econômica. Atualmente, é matéria-prima para a produção de aproximadamente 30 milhões de toneladas de açúcar e 35 milhões m³ de etanol (UDOP, 2020). Em outros países – Tailândia, Índia e Nigéria – essa cultura também se estabeleceu como uma cultura de elevadíssimo interesse agrônomo (Vilar et al., 2015). Há anos a Tailândia é o segundo maior exportador de açúcar no mundo, só perdendo para o Brasil (Caballero, 2020). A base do agronegócio da cana-de-açúcar são os programas de melhoramento genético destinados à desenvolver variedades cada vez mais produtivas para usos específicos e adaptados a diferentes condições ambientais (Morais et al., 2015). Por possuir um

genoma complexo, a planta tem suas espécies derivadas de híbridos oriundos de cruzamentos entre espécies do gênero *Saccharum*. No entanto, trabalhos abordando a funcionalidade das interações microbianas com a cana-de-açúcar, principalmente interações benéficas com leveduras (fungos unicelulares) são ainda escassos.

O objetivo desse trabalho foi caracterizar leveduras associadas aos colmos de híbridos interespecíficos de cana-de-açúcar. As variedades de cana-de-açúcar escolhidas como alvo de associações com leveduras são consideradas de grande importância econômica e/ou histórica. A variedade RB86-7515, por exemplo, está entre as mais cultivadas, totalizando 27,3% da área na região Centro-Sul (a maior área cultivada do país), segundo o Censo Varietal IAC realizado na safra 2017/18 na região Centro-Sul (Junior Braga, et al., 2019). Enquanto a variedade CB56-155 é um híbrido originado de linhagens provenientes de um dos primeiros e mais importantes programas de melhoramento genético da cana-de-açúcar no Brasil, na Estação Experimental, em Campos dos Goytacazes, RJ, de 1946 a 1972 e que já foram cultivadas em todo o País (Morais et al., 2015).

Historicamente, as leveduras estão, predominantemente, associadas a processos fermentativos sendo também encontradas em substratos contendo açúcares. Devido à síntese de açúcares simples, polissacarídeos e outros compostos de carbono, produtos esses oriundos da fotossíntese, as plantas tornam-se habitats excelentes para as leveduras (Ruivo, 2005; Rosa et al, 2007; Fuentefria et al., 2008).

Integrantes do reino Fungi, as leveduras são unicelulares com gerais características típicas dos fungos filamentosos (Kurtzman e Fell, 1998). A taxonomia convencional de leveduras é baseada principalmente em métodos que utilizam testes morfológicos, bioquímicos e fisiológicos que incluem fermentação de diferentes fontes de açúcares, assimilação de fontes de carbono e nitrogênio, crescimento em diferentes temperaturas, entre outros (Kurtzman et al., 2011). Contudo, a taxonomia convencional nem sempre alcança resultados conclusivos, não apresentando uma correta relação filogenética entre as leveduras. Para identificação mais segura, marcadores moleculares têm sido amplamente utilizados para maior inferência filogenética das populações fúngicas, pois não são influenciados por fatores ambientais em comparação aos caracteres

morfológicos e bioquímicos (Ferreira e Grattapaglia 1998; (Nei e Kumar, 2000). Pelo fato de estar presente em todos os organismos, que evoluíram de um ancestral em comum e também pela presença de regiões codificantes e não-codificantes, o DNA ribossômico (DNAr) tem sido bastante empregado em estudos taxonômicos (Valente et al., 1999).

Em leveduras, os genes ribossomais estão organizados em clusters que estão presentes em várias cópias no genoma. Entre os marcadores moleculares utilizados com propósito de identificação de espécies fungicas destaca-se o sequenciamento da região espaçador interno transcrito – ITS (*Internal Transcribed Spacer*), que compreende os fragmentos ITS1-5.8S-ITS2, separando os genes 18S (subunidade pequena) e 28S (subunidade grande) do rDNA (White et al., 1990; Porter e Golding, 2011). Nos últimos anos, esta região tem sido proposta como um marcador potencial de *barcode* para fungos (Schoch et al., 2012). Sendo assim, a região ITS foi escolhida nesse estudo para identificar as leveduras por ser uma região altamente conservada intraespecificamente, mas variável entre diferentes espécies, possibilitando a distinção em nível específico (Fungaro, 2000; Henry et al., 2000). Além disso, vários trabalhos têm demonstrado a eficiência do sequenciamento baseado na região ITS em estudos de variabilidade genética e localização geográfica (Velásquez, et al, 2007; Porter e Golding, 2011; Anderson e Cairney, 2004 e Seiffert, 2009, Pedro, 2017).

A região D1/D2 da subunidade maior do ribossomo – adotada para caracterizar espécies fúngicas muito antes do conceito *barcode* do DNA ser proposto – encontra-se sequenciada em grande parte das leveduras e sabe-se que essa região permite diferenciar quase todas as espécies conhecidas de leveduras ascomicéticas e basidiomicéticas, embora em algumas leveduras basidiomicéticas seja necessário sequenciar também as regiões ITS do rDNA (Fell et al., 2000, Scorzetti et al., 2002). Atualmente, ambos os bancos de dados referentes à região D1/D2 e ITS se apresentam como potentes ferramentas para a identificação segura de espécies de leveduras e as sequências D1/D2 e ITS geralmente apresentam resolução similar na diferenciação de espécies de leveduras, entretanto variações podem ocorrer dependendo da espécie (Kurtzman, 2014).

Sendo assim, as sequências obtidas das leveduras isoladas do colmo de cana-de-açúcar, utilizando primers específicos para o fragmento do gene que

codifica a região ITS (ITS1-5,8S-ITS2), e parte do gene que codifica a subunidade 28S (domínio D1/D2), foram confrontadas no programa BLASTNN no NCBI para verificar a similaridade com as leveduras depositadas no banco de dados. Essa ferramenta é prática do ponto de vista operacional, em razão da rapidez e facilidade de interpretação dos resultados e o alinhamento das sequências é preciso. Contudo, a confiabilidade taxonômica nos bancos de dados públicos ainda é considerada menor do que o ideal (Nilsson et al., 2008). Também a confiança nos resultados de identificação obtidos pela ferramenta BLASTN requerem cautela, porque, não existe um sistema de curadoria das sequências depositadas e há inexistência na atualização das sequências submetidas (Ramos, 2016).

A maioria das sequências eleitas como a espécie mais similar às leveduras isoladas nesse trabalho teve identidade superior ou igual a 97%. Para o sequenciamento da região D1/D2, cinco leveduras apresentaram similaridade de 100% com relação às sequências depositadas no banco de dados: RBC2 (identificada como *C. parapsilosis*), CBM5, CBM7 e SPM10 (ambas identificadas como *M. caribbica*), RBR1 (identificada como *R. mucilaginosa*).

Os parâmetros usados por Vieira et al., (2012) foram norteadores para a identificação preliminar de leveduras isoladas nesse estudo: (i) para identidades de sequência $\geq 98\%$, o gênero e a espécie foram aceitos; (ii) para identidades de sequência entre 95% e 97%, apenas o gênero foi aceito; (ii) para identidades de sequência $\leq 95\%$, os isolados foram rotulados como desconhecidos. Adicionalmente, o estudo de Hughes et al., (2009) postula que, para a identificação bem-sucedida de uma espécie, é necessário que a análise no BLAST resulte em uma cobertura maior que 80% e em uma similaridade igual ou superior a 98% para alguma entrada no banco de dados. Dentre as vinte leveduras analisadas nesse estudo, para a identificação com base na região ITS, 18 tiveram similaridade de 99% com as leveduras depositadas no banco de dados, 2 leveduras tiveram 98% e 1 teve 97%.

Infelizmente, não há critérios estabelecidos para determinar se duas sequências representam variantes genéticas da mesma espécie. Smith et al. (2007) e Morris et al. (2008), em estudos da estrutura da comunidade ectomicorrízica em uma floresta de seca, usaram uma estimativa de $\leq 3\%$ de divergência na sequência da região ITS para indicar co-especificidade. Essa

estimativa considerou uma taxa de erro de 0,2 a 1,2% gerada por PCR, clonagem e artefatos do sequenciamento unidirecional. Da mesma forma, os estudos de Izzo et al. (2005) usaram $\leq 4\%$ de divergência na sequência ITS como co-específico, com taxas de erro estimadas em 0,5% a 1%. O'Brian et al. (2005), Ryberg et al. (2008) e Walker et al. (2008) todos assumiram divergência de sequência ITS $\leq 3\%$ como indicativa de especificidade. Fell et al. (2000) publicaram as sequências D1/D2 de leveduras de basidiomicetos conhecidas a partir de comparações de táxons, notando que as cepas de uma espécie não apresentam mais que zero a três diferenças de nucleotídeos (0-0,5%), e as cepas que mostram seis ou mais substituições não-contíguas (1%) são espécies separadas. As cepas com substituições intermediárias de nucleotídeos também são provavelmente espécies separadas.

Em consequência disso, optou-se, até o momento, por mencionar as leveduras apenas pelo gênero. Assim, os gêneros *Candida*, *Hanseniaspora* e *Meyerozyma* pertencentes ao filo Ascomycota e o gênero *Rhodotorula* ao filo Basidiomycota. Nota-se que as leveduras ascomicéticas foram as mais abundantes dentre os isolados. Por certo, as leveduras ascomicéticas são mais frequentemente encontradas em substratos ricos em açúcares simples, como frutos e seus insetos polinizadores. Já as leveduras basidiomicéticas são mais encontradas em ambientes como solo e folha, onde os nutrientes disponíveis são mais complexos (Santos et al., 1996). Muitas delas desenvolveram mecanismos que permitiram a colonização do filoplano (Kurtzman e Fell, 1998), como exemplo, leveduras do gênero *Rhodotorula* produzem pigmentos carotenoides para se protegerem dos níveis de radiação que são mais altos na superfície de tecidos da parte aérea da planta do que no solo (Fonseca e Inácio, 2006).

Para análise da região ITS, primeiramente, comprovou-se que o produto amplificado gerou fragmentos com uma média geral de 600 a 700 pb. Esse resultado concorda com os de outros autores que encontraram fragmentos que variam em torno de 550 a 700 pb para a região ITS, dependendo do iniciador e do isolado analisado (Menezes et al., 2010). A análise da região ITS confrontada com banco de dados BLASTN/NCBI caracterizou as 20 leveduras isoladas como pertencentes às espécies de: *C. dosseyi* (SPC1), *C. parapsilosis* (RBC2 e RBC3), *H. vineae* (RBH1 e RBH2), *M. carpophila* (CBM1, SPM2, SPM3, SPM4, CBM5, CBM7, SPM9 e SPM10), *M. guilliermondii* (código CBM6 e CBM8) e *R.*

mucilaginosa (código RBR1, CBR2, RBR3, SPR4 e RBR5). Ao passo que para a região D1/D2, a análise caracterizou as 20 leveduras como sendo espécies: *C. dosseyi* (SPC1), *C. parapsilosis* (RBC2 e RBC3), *H. vineae* (RBH1 e RBH2), *M. caribbica* (CBM5, CBM7 e SPM10), *M. guilliermondii* (CBM1, SPM2, SPM3, SPM4, CBM8 e SPM9) e *R. mucilaginosa* (RBR1, CBR2, RBR3, SPR4 e RBR5). Nota-se que todas as leveduras pertencentes ao gênero *Candida*, *Hanseniaspora* e *Rhodotorula*, para ambos os marcadores moleculares, tiveram maior similaridade com as mesmas espécies de levedura. Enquanto que o gênero *Meyerozyma* houve divergência entre as espécies com maior similaridade dessas regiões, identificando as espécies como *M. carpophila* e *M. guilliermondii* na análise da região ITS e como *M. caribbica* e *M. guilliermondii* na análise da região D1/D2. Apenas a levedura CBM8, para ambos os marcadores, foi identificada como *M. guilliermondii* com similaridade de 99%, portando, não é possível esclarecer qual é a espécie das leveduras do gênero *Meyerozyma*. Outra razão para mencionar as leveduras isoladas do como de cana-de-açúcar apenas pelo gênero que pertencem.

Salienta-se que, embora não tenha identificado as leveduras, em nível de espécie, até o momento, há diversos trabalhos que o fizeram, inclusive com os meios primers utilizados nesse trabalho: para análise da região ITS (ITS1-5.8rRNA-ITS2) – *M. guilliermondii* e *M. caribbica* (Amorin, 2014; De Marco, et al., 2018), *R. mucilaginosa* (Amorin, 2014) e *H. vinea* (Cadez et al., 2002; Estevez-Zarzoso, 2001) – e para análise de domínio D1/D2 da região LSU – *M. guilliermondii* (Nutaratat et al., 2014; Duante, 2015), *R. mucilaginosa* (Russo et al., 2008; Duante, 2015; Gadanho, et al., 2006) e *C. parapsilosis* (Linton, et al., 2007). Há, portanto, a necessidade de mais testes moleculares utilizando outros marcadores a fim obter evidências seguras da identificação das espécies isoladas nesse trabalho. A região espaçador intergênico (*intergenic spacer*, IGS) é uma região proposta a ser analisada. Segundo Hibbett (1992), o mais alto grau de variabilidade está nessa região, sendo suficiente para discriminar isolados em nível específico e intraespecífico. As sequências têm sido usadas com sucesso em separar linhagens estreitamente relacionadas de *Cryptococcus* (Fan et al. 1995; Diaz et al. 2000), *Xanthophyllomyces* (Fell e Blatt, 1999). Entretanto, essa região tende a ser altamente substituída e devido à ocorrência de sequências

repetitivas e regiões homopoliméricas, a região IGS tende a ser difícil de sequenciar para algumas espécies (Kurtzman e Fell, 2006).

Com o propósito de incorporar dados que concretizem a identificação das leveduras isoladas do colmo de cana-de-açúcar, verificou-se a relação filogenética, baseada na região ITS do rDNA. As análises foram feitas isoladamente para o filo Basidiomycota, gênero *Rhodotorula* (Apêndice A, Figura 6A), e para o filo Ascomycota, gêneros *Hanseniaspora* e *Meyerozyma* (Apêndice A, Figura 6B), relacionando com as espécies tipo (Apêndice A, Tabela 5).

Nota-se que a separação entre as *Hanseniaspora* sp. e *Meyerozyma* sp. está bem delimitada, com ramos bem suportados com probabilidade posterior (pp) 1,0. Corroborando com os resultados obtidos no alinhamento BLASTN, assume-se que as leveduras RBH1 e RBH2 pertencem ao gênero *Hanseniaspora* e as leveduras CBM1, SPM2, SPM3, SPM4, CBM5, CBM6, CBM7, CBM8, SPM9 e SPM10 ao *Meyerozyma*. No entanto, de acordo com a árvore gerada, de forma geral, não se observou concordância com os dados encontrados no alinhamento do BLASTn em nível de espécie, onde as sequências da região ITS foram similiares às espécies depositadas no banco de dados, enquanto que a maioria das leveduras analisadas não apresentou uma estreita relação com a espécie tipo de referência.

As espécies de *Hanseniaspora* estão agrupadas em dois grandes clados bem suportados (1,0 pp) e esses possuem vários subclados agrupados em virtude das espécies tipo (Apêndice A, Figura 6B). Dentre eles, observa-se a relação filogenética estreita (1,0 pp) das leveduras RBH1 e RBH2 com a espécie tipo *H. vinea*. Dado que reforça a identificação sugerida através do alinhamento BLASTN. Nota-se que essas leveduras possuem sítios de nucleotídeos bem conservados (731/758) (Apêndice C, Figura 9). Sugerindo que as leveduras RBH1 e RBH2 sejam realmente da espécie *H. vinea*.

De acordo com sua análise filogenética de sequências parciais de nucleotídeos 18S e 26S rDNA, Yamada et al. (1992) propuseram a divisão do táxon em dois gêneros: *Kloeckeraspora*, para incluir *Hanseniaspora occidentalis*, *H. osmophila* e *H. vineae*, e *Hanseniaspora* para incluir *H. guilliermondii*, *H. úvar* e *H. valbyensis*. No entanto, os resultados de Boekhout et al. (1994), que analisaram 26S parcial sequências de DNA ribossômico, não suportam a retribuição de certas espécies de *Hanseniaspora* ao gênero *Kloeckeraspora*.

Então, mantendo todas as 6 espécies pertencentes ao gênero *Hanseniaspora*. As espécies de *Hanseniaspora* formam duas linhas filéticas. O primeiro grupo que contém *H. guilliermondii*, *H. uvarum* e *H. valbyensis*. O segundo grupo formado por uma linha evolutiva mais diversa, abrangendo as espécies *H. occidentalis*, *H. osmophila* e *H. vineae* (Esteve-Zarzoso, et al., 2001).

As espécies de *Meyerozyma* (Apêndice A, Figura 6B) estão agrupadas em três clados principais: (1) composto pelas espécies tipo de *M. caribbica* e *M. guilliermondii*; (2) pela levedura CBM6; e (3) pelas leveduras CBM1, SPM2, SPM3, SPM4, CBM5, CBM7, CBM8, SPM9 e SPM10, agrupando-se em vários clados menores. As leveduras SPM2 e CBM5 fortemente tendem a pertencer à mesma espécie, pois o clado aparece bem sustentado 0,96 pp. Para análise feita no BLASTn elas são da espécie *M. carpophila*, não incluída na árvore filogenética, embora nota-se que essas leveduras possuem sítios de nucleotídeos conservados (557/682) em comparação com espécie tipo depositada no banco de dados (Apêndice C, Figura, 10). As demais leveduras desse clado agrupam-se com valor baixo de probabilidade (0,88/0,89 pp), supondo que elas não pertençam à espécie *M. caribbica* e/ou *M. guilliermondii*. Apesar da similaridade de 99% sustentar que as leveduras CBM6 e CBM8 sejam *M. guilliermondii*, elas tiveram uma baixa relação filogenética com a espécie tipo. O alinhamento também mostra mais sítios conservados de nucleotídeos dessas leveduras com *M. guilliermondii* do que com *M. carpophila* e *M. caribbica*. Portanto, baseado na análise filogenética, a levedura CBM6 se encontra em um clado isolado das leveduras de referência, indicativo de que essa levedura seja uma nova espécie de *Meyerozyma*, assim como as demais leveduras desse gênero. Ademais, as leveduras CBM5, CBM7 e SPM10 foram 100% similares nas sequências D1/D2 na análise do BLASTN com *M. caribbica*. Com isso, há necessidade de se estabelecer novas relações filogenéticas, incluindo as baseadas na análise da região D1/D2, a fim de propor com exatidão a identificação em nível de espécie as *Meyerozyma* sp.

M. caribbica (anamorfo *Candida fermentati*) e *M. guilliermondii* (anamorfo *Candida guilliermondii*) são duas espécies de leveduras intimamente relacionadas pertencentes ao complexo de espécies *M. guilliermondii* (Bai et al. 2000; Vaughan-Martini et al. 2005). Cabe ressaltar que a nomenclatura de *M. guilliermondii* é nova, pois até o ano de 2010 o estado teleomorfo de *C.*

guilliermondii pertencia à espécie de *Pichia guilliermondii* (Papon et al., 2013). Utiliza-se a nomenclatura de *M. guilliermondii* e *M. caribbica*, pois o nome principal é o baseado no estado sexual ou teleomorfo (Kurtzman, Fell e Boekhout, 2011). *C. carpophila* é sinônimo homotípico (ou sinônimo nomenclatural) de *M. carpophila* (Phaff e M.W. Mill.). Análise filogenética baseada em sequências do gene r1NA de D1/D2 LSU revelou que *C. carpophila* e várias outras espécies de *Candida* são membros do clado de *Meyerozyma* (Kurtzman e Robnett 1998).

M. guilliermondii compreende um complexo geneticamente heterogêneo pertencente ao clado Saccharomycotina CTG (Dujon, 2010; Kurtzman, 2011). Tal complexo é composto por 50 espécies intimamente relacionadas e fenotipicamente indistinguíveis, tais como *M. guilliermondii*, *M. caribbica*, *Candida carpophila*, *Candida smithsonii*, *Candida athensensis*, *Candida elatedarum* e *Candida glucosophila*. Como uma identificação morfológica dentro do complexo é impossível, vários protocolos moleculares usando microssatélites, polimorfismos do espaçado interno transcrito (*internal transcribed spacer*. ITS) e RFLP (polimorfismo de fragmento de restrição) da região ITS foram desenvolvidos (Romi et al., 2014; Merseguet et al., 2015; Wrent et al., 2016).

Em termos de reconhecimento de espécies pelas sequências D1/D2, *M. caribbica* e *M. guilliermondii* diferem em três nucleotídeos, *M. caribbica* e *C. carpophila* por dois nucleotídeos, e *M. guilliermondii* e *C. carpophila* por um nucleotídeo. Consequentemente, a extensão das diferenças de D1/D2 entre espécies estreitamente relacionadas para este clado foi menor do que a observada para cepas de espécies em certos outros clados de leveduras de ascomicéticos (Kurtzman e Robnett 1998, Kurtzman et al. 2008). Outro estudo mostrou, utilizando técnicas como RFLP da região ITS, que *M. guilliermondii* e *M. caribbica* se diferenciam em um a três nucleotídeos através de sequências da região ITS1-5.8S-ITS2 (Wahengbam Romi et al., 2014). Além disso, *M. caribbica*, apesar de uma ampla literatura sobre as dificuldades de discerní-la de *M. guilliermondii*, parece estar mais intimamente relacionado a *C. carpophila* (De Marco, et al., 2018). A dificuldade da distinção fenotípica entre *M. caribbica* e *M. guilliermondii* também pode justificar as identificações incorretas que usualmente são encontradas pelo sequenciamento da subunidade grande do gene rRNA nos domínios D1/D2 (Wahengbam Romi et al., 2014).

Diferentemente de *M. guilliermondii* e *M. caribbica*, ainda não foi reportado o estado sexual para a levedura *R. mucilaginosa* – anteriormente, descrita como *R. rubra* (Sampaio, 2011; Bennett, 1990). As espécies de *Rhodotorula* foram analisadas em uma árvore filogenética separada contendo várias espécies de referência (Apêndice A, Figura 6A). Os subclados contendo os pares de espécies de referência aparecem fortemente sustentados com valores de probabilidade 1,0. As espécies caracterizadas nesse trabalho agrupam-se em dois grupos distintos dentro do clado maior do gênero: (1) um clado é formado unicamente pela levedura RBR1 (1,0 pp); e (2) um clado maior, pouco sustentado, é formado pelas CBR2, SPR4, RBR3 e RBR5, onde a levedura RBR5 forma um subclado isolado das demais.

Interessantemente, apesar de todas as *Rhodotorula* sp. terem alta similaridade (99%) no BLASTN com a espécie *R. mucilaginosa*, não há nenhum ramo agrupado composto por essas espécies e as espécies tipo. Supondo que as leveduras isoladas nesse trabalho (RBR1, CBR2, RBR3 SPR4 e RBR5) possam ser novas espécies de *Rhodotorula*. Vale ressaltar, que essa análise filogenética levou em consideração apenas as sequências da região ITS e que houve uma similaridade de 100% da levedura RBR1 para a região D1/D2.

Fell et al. (2000) descreveram sete novas espécies do gênero *Rhodotorula*, de acordo com as diferenças na região D1/D2 da LSU do rDNA. São *Rhodotorula creatinivora*, *Rhodotorula cresolica*, *Rhodotorula laringis*, *Rhodotorula pallida*, *Rhodotorula slooffiae*, *Rhodotorula vanillica* e *Rhodotorula yarrowii*. O gênero *Rhodotorula* é polifilético, inicialmente composto por apenas oito espécies (Kreger-Van Rij, 1984; Fell e Statzell-Tallman, 1998) expandiu-se acentuadamente por vários fatores, incluindo os avanços de técnicas moleculares aprimoradas para identificação de espécies e, principalmente, a redefinição do gênero *Candida* e a segregação de espécies basidiomicéticas em *Rhodotorula* e *Cryptococcus*, com base na composição de hidrolisados da parede celular, particularmente a xilose, encontrada apenas no último gênero (Weijman e Rodrigues de Miranda, 1988; Weijman et al., 1988).

Outro dado importante a se considerar é o grupo de leveduras associadas às variedades de cana-de-açúcar. Considerando os grupos de leveduras encontrados em cada variedade de cana-de-açúcar, *Hanseniaspora* sp., (RBH1 e RBH2) e as *Candida* sp. (RBC2 e RBC3) são isolados exclusivos da variedade

RB86-7515. Enquanto que a outra espécie do gênero *Candida* (SPC1) foi isolada da variedade SP80-3280. As *Meyerozyma* sp. tiveram uma ampla ocorrência, ambas de 50%, apenas nas variedades CB56-155 e SP80-3280. Enquanto que as *Rhodotorula* sp. foram encontradas em todas as três variedades de cana-de-açúcar. Esses dados são um indicativo preliminar, mesmo que comedido, de que essas leveduras possuem uma forte associação benéficamente com a cana-de-açúcar, pois as leveduras pertencentes ao clado *Candida*, *Meyerozyma* e *Rhodotorula* estão presentes em todas as variedades analisadas que foram obtidas por diferentes programas de melhoramento e em diferentes localidades. E, em nível de gênero, as leveduras do colmo de cana-de-açúcar, também são encontradas associadas em cultivares de cana de países biogeograficamente distintos do Brasil. Pressupondo que a cana-de-açúcar seja microambiente propício à colonização de espécies de leveduras e que essas leveduras residentes do colmo de cana-de-açúcar foram sendo selecionadas durante as gerações em decorrência dos benefícios promovidos para a cultura.

Trabalhos já descreveram leveduras associadas à cana-de-açúcar. Olasupo et al., (2003) isolaram os gêneros *Candida* (espécie *C. tropicalis* e *C. pseudointermedia*) e *Hanseniaspora* (espécie *H. guilliermondii*) associados a cascas de colmos de cana-de-açúcar na Nigéria, gêneros também associados ao colmo de cana-de-açúcar em Campos dos Goytacazes/RJ – Brasil, descritos nesse trabalho. Na Tailândia, Limtong et al., (2014) identificaram na superfície foliar leveduras pertencentes ao gênero *Candida* (*C. tropicalis*, *C. nivariensis* e outras 10 espécies do mesmo gênero), ao gênero *Hanseniaspora* (*H. guilliermondii*), ao gênero *Meyerozyma* (*M. caribbica*) e ao gênero *Rhodotorula* (*R. mucilaginosa*, *R. sesimbrana* e *R. taiwanensis*). E, Limtong e Koowadjanakul (2012), no filoplano de cana-de-açúcar, também na Tailândia, isolaram leveduras que pertenciam também a esses gêneros: *Candida* (incluindo *C. parapsilosis*), *Meyerozyma* (*M. guilliermondii*) e *Hanseniaspora* (incluindo *H. opuntiae*, *H. burtonii*, *H. guilliermondii* e *H. thailandica*).

No Brasil, a levedura *R. mucilaginosa* foi a mais prevalente entre as leveduras isoladas na maioria das superfícies de cana-de-açúcar, seguidas por espécies do gênero *Candida* (incluindo *C. austromarina*, *C. azyma*, *C. guilliermondii* e *C. maltosa*) (de Azeredo et al., 1998). Silva et al., (2016) ao avaliar o microbioma da cana-de-açúcar, incluindo as comunidades fúngicas

endofíticas e exofíticas associadas aos diferentes tecidos, verificaram que os colmos são dominados por grupos de leveduras que representam mais de 12% da abundância relativa total e o gênero *Candida* representa até 9,4% da abundância relativa nestes tecidos. Leveduras pertencentes ao gênero *Hanseniaspora* e *Meyerozyma* também tiveram uma presença marcante.

Assim como é escasso estudos que abordam a diversidade de leveduras associadas à cana-de-açúcar, é limitado, não apenas em cana-de-açúcar, os estudos que descrevam os benefícios de interações entre plantas e leveduras. Na literatura, as interações benéficas com bactérias, especialmente rizobactérias, (Vejan et al., 2016; Gouda et al., 2018) ou as interações benéficas com fungos micorrízicos (Balestrini e Lumini 2018; Vannette et al., 2012) são as estudadas extensivamente. Nessa área, apesar de as leveduras serem bem menos estudadas, recentemente, são alvo de pesquisas que têm correlacionado algumas características similares, principalmente no que tange à produção de alguns metabólitos marcadores comuns, considerados característicos de interações benéficas à promoção vegetal.

É possível conceber pressuposições de que as associações com as leveduras são capazes de perdurar durante o processo de dispersão da cana-de-açúcar. Se por um lado, os dados aqui obtidos não são suficientes ainda para apontar com clareza qual a natureza desta ancestralidade, por outro, com base em análises da microbiota presente em amostras de cana-de-açúcar de diferentes localidades, é possível definir que existe uma dinâmica seletiva e conservativa nas interações elucidadas, que podem vir a revelar um papel chave das leveduras no crescimento, desenvolvimento e respostas destas plantas ao estresse biótico e abiótico ao longo de gerações e das dispersões experienciadas por esta cultura. É possível que esses micro-organismos tenham tido um papel adaptativo fundamental durante a distribuição biogeográfica da cana-de-açúcar e que os benefícios mútuos durante a interação das leveduras com a cana-de-açúcar tenham favorecido a sobrevivência e disseminação de ambos os organismos nos mais diversos ambientes tropicais em que estas interações têm sido identificadas. Os gêneros *Candida*, *Hanseniaspora* e *Meyerozyma* são exemplos de gêneros amplamente distribuídos em diferentes localidades geográficas onde houve a disseminação da cana-de-açúcar, como já exemplificado acima.

Os seres humanos, provavelmente, mediaram a dispersão de diversas espécies ao longo da história (Boivin et al., 2016). Porém, estudar a dispersão de organismos é um processo complexo, que inclui o levantamento de dados históricos precisos da partida (local de origem), da transferência (movimento) e do estabelecimento no novo local de reprodução (adaptação) (Bullock et al., 2018). Apesar do presente trabalho não haver explorado as bases históricas e biogeográficas necessárias para se traçar um claro perfil de dispersão das espécies aqui isoladas e caracterizadas, as propriedades pró-adaptativas comuns reveladas podem ser consideradas como indicativas da existência de uma ainda inexplorada ancestralidade de significativa relevância funcional.

Dois cenários básicos podem ser teorizados, um primeiro que pode designar como hipótese da ancestralidade direta, no qual espécies de leveduras com propriedades pró-adaptativas, encontradas na filosfera de canas-de-açúcar dispersas ao longo do cinturão de atividade canavieira ao redor do globo, derivem todas de cepas ancestrais comuns presentes na filosfera das espécies parentais nativas da Oceania e do sudeste asiático; sendo suas respectivas progênes transferidas diretamente, infectando e colonizando ininterruptamente os tecidos de cada uma das sucessivas variedades de cana derivadas das parentais nativas.

Em um segundo panorama, pode trabalhar a hipótese da existência de características comuns conservadas no micro-ambiente da filosfera da cana, compartilhadas por todas as variedades atuais, cujas características ancestrais deste meio filosférico vêm selecionando um mesmo conjunto de espécies que já estariam antecipadamente presentes em todos os nichos ecológicos, das selvas originais neozelandesas, passando pelo sudeste asiático, Índia, África equatorial e chegando até as nossas terras tropicais americanas.

É importante mencionar que as migrações humanas são responsáveis pela dispersão de micro-organismos, incluindo os fungos (Golan e Pringle, 2016; Breurec et al., 2011). E, tal fator antrópico é sempre preponderante quando se trata de espécies cultivadas. Na prática, a cana-de-açúcar é geralmente propagada vegetativamente utilizando-se frações dos colmos adultos (toletes), método convencional que pouco mudou desde o início do cultivo da cultura (da Silva, 2017). Esses tecidos germinativos consistem em importantes veículos para as comunidades microbianas residentes nas espécies parentais. A mesma correlação é feita quando se leva em consideração o transporte de colmos

durante a distribuição geográfica da cana-de-açúcar, contribuindo para que as espécies ancestrais tenham sido dispersas e propagadas em sucessivos cultivos.

As relações simbióticas estabelecidas entre micro-organismos e plantas são bem comuns e acredita-se serem uma condição fundamental na flora planetária, sugerindo que estes simbiontes não funcionam como indivíduos autônomos mas, sim, integram entidades ecológicas únicas, compostas por diversas comunidades de micro-organismos simbióticos que tiveram uma grande influência na adaptação e evolução das plantas que os hospedam (Sapp et al., 2004; Zilber-Rosenberg e Rosenberg, 2008; Bacon et al., 2002; Schardl et al., 2001). Depois de uma espécie microbiana colonizar um habitat em potencial, a capacidade de crescer e se espalhar rapidamente podem determinar a distribuição e as funções dessa espécie em uma comunidade (Zhang et al., 2018; BenJacob et al., 2016). A filosfera representa um habitat ideal, com provimento de água e energia na forma de fotoassimilatos fornecidos vitaliciamente pela planta hospedeira. Devido a esta estreita associação ecológica, as plantas são excelentes agentes de dispersão através de sementes, folhas senescentes ou galhos, explicando a ampla faixa geográfica de dispersão dos fungos (Golan e Pringle, 2016). Durante essas interações, os micro-organismos podem promover o crescimento vegetal por proporcionar o aumento da aquisição de nutrientes (no que tange a interações de planta com fungos, um exemplo prevalente é a aquisição de fósforo) ou por produzir/ou modular o nível de hormônios vegetais (por exemplo o ácido indol-3-acético, o mais predominante em tais interações) (Glick, 2012). É notável que as associações de micro-organismos desempenham um papel fundamental na agricultura e nos processos ecossistêmicos (Cho et al., 2012; Gibbons et al., 2015).

Dados de diversidade microbiana de cana-de-açúcar também sugerem que mais de 90% de todas as unidades taxonômicas operacionais presentes nas raízes, caules e folhas também estavam presentes em amostras do solo, sugerindo que a diversidade microbiana presente no solo é capaz de colonizar os órgãos das plantas em estágios iniciais do desenvolvimento das mesmas (Silva et al., 2016), e obviamente, que a microbiota residente dos tecidos da cana também pode residir nos solos e destes se dispersar pelas gerações posteriores de plantas neles cultivadas. Então, pode-se trabalhar também a hipótese de que as leveduras encontradas associadas à cana-de-açúcar são provenientes da

microbiota residente em solos, os quais possuem características semelhantes, apesar de serem biogeograficamente distintos. Em contrapartida, as leveduras por seleção natural foram se adaptando metabolicamente às condições ambientais locais, criando mecanismos de resistência.

Diversas espécies que também pertencem aos gêneros caracterizados nesse trabalho também foram encontradas e associadas a outras espécies de plantas e em diferentes habitats, sugerindo que esses micro-organismos possuem uma regulação metabólica aprimorada a fim de adaptar-se a diversas condições impostas pelo ambiente. Corroborando com a tese da existência do possível papel das leveduras ancestrais colonizadoras de cana-de-açúcar no crescimento, via contribuição no desenvolvimento de respostas das plantas aos estresses bióticos e abióticos, influenciando positivamente em adaptações da fisiologia, ecologia e evolução durante o estabelecimento da cultura.

Espécies de *Candida* sp. e *M. guilliermondii* foram isoladas e identificadas como endófitos de caules da planta medicinal brasileira *Solanum cernuum* (Vieira et al., 2012), *Rhodotorula* sp. isoladas de folhas de tomate (Larran et al., 2001) e *M. guilliermondii* de folha de arroz (Nutaratat et al., 2014). *R. mucilaginosa* e *M. caribbica* foram isoladas da superfície externa da folha de capim vetiver (Limtong et al., 2015) e *M. caribbica* de *Drosera spatulata* (Fu et al., 2016). *H. vineae* foi isolada na fermentação de uvas *Isabella* (variedade *Vitis labrusca* L.) (Raymond Eder et al., 2017) e de grãos de café de Minas Gerais, onde a espécie *M. caribbica* também foi encontrada (de Carvalho Neto et al., 2017). Alguns bons exemplos figuram entre as espécies caracterizadas no presente trabalho, tais como, *C. parapsilosi* isolada de águas hipersalinas (Butinar et al., 2005). *Candida* sp. presente em sedimentos profundos do Mar da China Meridional (Lai et al., 2007). Nakayan et al., (2013) isolaram *M. guilliermondii* e *R. mucilaginosa* do solo. A capacidade das leveduras colonizarem esses diversos ambientes – solo, água doce e marinha, plantas, além de animais e alimentos – indica que são organismos dotados de um metabolismo versátil por utilizarem diferentes fontes de nutrientes para a sobrevivência (Deak, 2006).

Apesar das inúmeras mudanças ambientais em que as leveduras contínuas são continuamente expostas no habitat natural, para manter condições ótimas de crescimento, elas são capazes de manter o ambiente intracelular balanceado, prevenindo flutuações internas que podem resultar em uma variedade

de perturbações, e consequentemente, na redução da atividade enzimática e interrupção do fluxo metabólico (Gasch e Werner Washburne, 2002).

Os estresses fisiológicos ocasionados por ambientes ácidos podem ser uma pressão para a sobrevivência tanto em plantas como em levedura. Por essa razão, esse estudo visou analisar a capacidade das leveduras associadas ao colmo de cana-de-açúcar em resistirem e sobreviverem em condições de cultivo em pHs ácidos. Os dados indicaram que todas as leveduras associadas ao colmo das três variedades bem distintas de cana-de-açúcar foram capazes de crescer *in vitro* a condições ácidas de cultivo (pH 6,0, 4,5 e 3,0), portanto são consideradas ácido-resistentes.

Embora a exposição das células de leveduras a baixos valores de pH seja uma condição de estresse que afeta o metabolismo celular as leveduras preferem um meio levemente ácido (pH ótimo entre 4,5 e 5,5) (Carmelo et al., 1998), corroborando os dados apresentados que mostraram que a média de crescimento das leveduras foi significativamente superior em pH 4,5 do que no pH 3,0 e 6,0. No entanto, as leveduras toleram uma ampla faixa de pH entre 3,0 e 10,0 (Tanghe, 2006). Fato comprovado pelas leveduras CBM6 e SPM10 (*Meyerozyma* sp.) que cresceram mais no pH 3,0 do que quando cultivadas em pH 4,5 e 6,0.

Tais dados estabelecem uma prospecção inicial sobre a capacidade das leveduras isoladas do colmo de cana-de-açúcar se disseminarem no decorrer do manejo em solos ácidos, cada vez mais prevalentes nas zonas tropicais. Bem como, abre discussões para a seleção de leveduras já adaptadas às condições ambientais de cultivo das plantas com propósito de melhorar a estabilidade das comunidades microbianas naturais ou sintéticas com a finalidade de promover benefícios em diversos sistemas agrícolas.

As comunidades microbianas associadas ao colmo de cana-de-açúcar também podem ser relevantes para o processo de fermentação industrial e produção de etanol. As leveduras capazes de crescer nos meios mais ácidos podem ser alvos de estudos em processo de fermentação alcoólica industrial, pois este é um processo caracterizado por um intenso reciclo de células de levedura com constante exposição a baixos valores de pH (Fernandes de Melo, 2006; da SilvaFilho, 2005). As espécies *Saccharomyces* são bem conhecidas industrialmente por possuírem tal capacidade (Walker e Stećwart, 2016).

Poucos estudos avaliaram a comunidade microbiana durante o processo fermentativo (Costa et al., 2015) e poucos têm considerado a origem da microbiota tecidual contaminante e seu impacto no rendimento do processo fermentativo. Entretanto, a levedura RBH1 (*Hanseniaspora* sp.) associada ao colmo de cana-de-açúcar, obteve maior crescimento quantitativo *in vitro* em meio de cultivo com pH 3,0, embora não haja diferenças estatisticamente significativas durante o crescimento nos três diferentes pHs analisados, indicando a resitência da levedura a condições ácidas de crescimento. A espécie *H. vineae*, por exemplo, é uma espécie que está emergindo como promissora para a produção de vinho de qualidade em comparação com outras espécies não *Saccharomyces*, principalmente, porque produz vários compostos aromáticos essenciais (Viana et al., 2011; Medina et al., 2013; Lleixà et al., 2016; Giorello et al., 2019).

Outro estresse fisiológico ocasionado atrelado a ambientes ácidos, quando o pH está abaixo de pH 5,0, é a elevada concentração de íons de alumínio tóxicos (Al^{3+}). A toxicidade está principalmente relacionada a mudanças na morfologia da raiz que reduz a absorção de nutrientes e água, interferindo no crescimento e no desenvolvimento das plantas (Sade et al., 2016; Singh et al., 2017). Por ser um cátion trivalente, o Al é fortemente adsorvido pelo solo e, assim, sua concentração na solução do solo é baixa ($\mu\text{mol/l}$) (Haynes e Mokolobate, 2001). Há dificuldade para a definição de um valor crítico para o Al do solo que provoca toxidez às plantas, mas é conhecido que mesmo em baixas concentrações, o Al quando presente na solução intersticial do solo já se torna tóxico para maioria das espécies vegetais (Sobral e Guimarães, 1992).

Portanto, leveduras associadas à cana-de-açúcar e a outras culturas precisam ser também capazes de tolerar esse metal a fim de garantir sua sobrevivência. Todas as leveduras associadas ao colmo das três variedades tiveram a capacidade de crescer na presença de concentrações tóxicas de Al (0,5 mM e 1 mM), portanto são consideradas alumínio-resistentes. As leveduras SPM10 e CBM6 – *Meyerozyma* sp. – e a levedura SPR4 – *Rhodotorula* sp – destacaram-se, porque, no pH 4,5 e 3,0, foram as leveduras que tiveram maior média de crescimento, bem como quando analisado o crescimento no cultivo contendo 0,5 mM e 1 mM de Al.

Os resultados desse trabalho permitem constatar que a maioria das leveduras associadas ao colmo de cana-de-açúcar é capaz de crescer em pH

ácidos e de tolera concentrações de Al. Essa capacidade pode ter sido evolutivamente selecionada por pressões ambientais características da maioria dos solos da faixa intertropical onde o cultivo da cana-de-açúcar emergiu. Neste contexto, esses dados podem contribuir para o desenvolvimento de inóculos mais eficazes a base de micro-organismos com características adaptativas ancestrais, que perduram nos tecidos de variedades modernas, e que podem ser manipulados com intuito de promover o crescimento vegetal.

Interessantemente, a levedura CBM8 – *Meyerozyma* sp. – na presença de 0,5 mM e 1,0 mM de Al cresceu significativamente mais do que na ausência de alumínio. Façanha e Okorokova-Façanha (2002) encontraram baixas concentrações de Al (50-100 μ M AlCl₃), mais baixas do que as concentrações consideradas da fitotoxicidade, capazes de promover o crescimento da raiz, relacionado à estimulação da bomba de H⁺ da membrana plasmática em uma variedade de milho tolerante ao Al. É possível que para a levedura CBM8 (*Meyerozyma* sp) as concentrações 0,5 mM e 1,0 mM de Al sejam abaixo do considerado fitotóxico, sugerindo que ela é bastante resistente ao Al. Na levedura *Y. lipolytica*, Lobão (2007) observou que 1 mM Al estimula em aproximadamente 85% o transporte de H⁺ mediado por P H⁺-ATPase de membrana plasmática. O estímulo das H⁺-ATPases na levedura CBM8 pode correlacionar-se ao aumento do crescimento, no entanto há necessidade de dados que comprovem efetivamente essa hipótese. Yan et al. (1998) demonstraram que as H⁺-ATPases da membrana plasmática poderiam contribuir significativamente no alívio do efeito tóxico em plantas. Acreditava-se que o Al altere propriedades da membrana plasmática que podem ser importantes como barreiras para o movimento passivo do Al em células da raiz (Kinraide *et al.*, 1998). E, também que o Al melhore o crescimento aliviando a toxicidade do H⁺ (Kinraide, 1993), pois o Al aumenta a polaridade elétrica da membrana celular e estimula a extrusão de H⁺ e a extrusão contínua de H⁺ pode ser essencial para o crescimento radicular de plântulas de milho em pH baixo (Yan et al., 1992).

Para as espécies do gênero *Rhodotorula*, trabalhos corroborando com os dados apresentados sobre a sua capacidade de tolerar o Al, em concentrações até mais elevadas (100 mM, 300 mM e 500 mM por Nguyen et al., 2001 e 6 mM por Silambarasan et al., 2019). Wang e colaboradores (2013) relataram que o tratamento com Al levou ao aumento do acúmulo de citrato na célula. Sabe-se

que os ácidos orgânicos desempenham papéis importantes na desoxicidade de Al (Ma, 2007; Sasse et al., 2018) e são eficazes na liberação de fósforo inorgânico nos solos (Weiet al., 2010). Lobão e colaboradores (2007) sugeriram que a tolerância da levedura *Y. lipolytica* ao Al (0,5 mM e 1,0 mM) seja devido à sua capacidade de produção de ácidos orgânicos que são capazes de se complexar com o Al, um processo descrito para plantas (Kochian et al., 2004; Shen et al., 2005). Adicionalmente, diversas espécies e cultivares vegetais tolerantes ao Al podem expressar uma H^+ -ATPases que seja estimulada por Al. Na qual o Al poderia regular o gradiente eletroquímico de H^+ gerado por esta bomba, que poderia dirigir tanto a captação dos nutrientes como o efluxo de ácidos orgânicos (Façanha e Okorokova-Façanha, 2002).

Assim como em plantas, a exsudação de ácidos orgânicos por micro-organismos está mutuamente correlacionada a mecanismos de tolerância ao Al (Ma, 2001; Panhwaret al., 2015; Sharma et al., 2013; Seshachala e Tallapragada, 2012) e de solubilização de P (Souchie et al., 2006). Portanto, a prospecção das associações simbióticas de plantas com leveduras com a capacidade de produzir ácidos orgânicos, pode levar melhorias na aquisição de nutrientes proporcionada durante a interação – seja por maior disponibilidade através da solubilização, seja criando uma proteção contra os danos radiculares causados pelo Al. Tais estudos têm fomentado o desenvolvimento de métodos mais eficientes de inoculação, como um fator diferenciador para o aumento da produtividade (Murphy et al., 2018, Hardoim et al., 2015; Compant et al., 2019).

Vassileva et al., (2000) correlacionaram a capacidade da levedura *Y. lipolytica* produzir ácido cítrico com solubilizar simultaneamente fosfato de rocha. No entanto, há uma pequena quantidade de trabalhos que evidenciam a capacidade de leveduras solubilizarem nutrientes e as leveduras não são tradicionalmente reconhecidas como potenciais inoculantes do solo, apesar de o papel no aumento da atividade microbiana do solo e em nível de nutrientes inorgânicos já ter sido demonstrado há muito tempo (Larsen e Jakobsen 1996). Analisando as leveduras isoladas do colmo de cana-de-açúcar, dentre as do clado *Rhodotorula* sp.: três foram capazes de solubilizar P (CBR2, SPR4 e RBR5), apenas uma de solubilizar Zn (RBR3) e a RBR1 não solubilizou nenhum dos nutrientes. Todas as leveduras do clado *Meyerozyma* sp. e do clado *Candida* sp. solubilizaram ambos os nutrientes. Ressaltando, em comparação com as vinte

leveduras isoladas, as leveduras SPM9 e SPM10 (*Meyerozyma* sp) as mais solubilizadoras de Zn e RBC3 (*Candida* sp.) a que mais solubilizou P. O trabalho de Hesham e Mohamed (2011) também descreveu a capacidade em solubilizar fosfatos inorgânicos por leveduras associadas com plantas de cana-de-açúcar no Alto Egito, porém em amostra de solo. Os trabalhos de Nakayan et al. (2013) e Xiao et al.(2013) corroboram com os dados apresentados nesse estudo, pois também descrevem a capacidade das leveduras caracterizadas nesse trabalho em solubilizar P. Nakayan et al. (2013) também mostram que as leveduras do clado *Meyerozyma* sp. solubilizam mais P que as do *Rhodotorula* sp. Em ordem crescente de solubilização de P estão as leveduras *M. guilliermondii*, *M. caribbica* e *R. mucilaginosa*. Enquanto que Xiao et al.(2013) descreveram que a levedura da espécie *C. rugosa*, gênero *Candida*, foi a mais eficaz na solubilização de P. Análogo à levedura RBC3 (*Candida* sp.), isolada do colmo de cana-de-açúcar a mais solubulizadora de P. Fortalecendo o potencial das leveduras em solubilizar P, também pertencente ao gênero *Candida*, a levedura da espécie *C. tropicalis* HY colonizou rapidamente as raízes das mudas do arroz, aumentando a disponibilidade de P e estimulando o crescimento das mudas (Amprayn et al., 2012). Outras leveduras também foram capazes de melhorar o crescimento e a nutrição de P dos organismos associados, incluindo fungos micorrízicos (Vassileva et al., 2000; Mirabal Alonso et al., 2008), tomate (Vassileva et al., 2000) e milho (Hesham e Mohamed, 2011).

Diante dessas circunstâncias, a solubilização biológica pelas leveduras surge como uma alternativa para elevar a disponibilidade de nutrientes em solos, favorecendo sobremaneira o crescimento de plantas (Alori et al., 2017; Shaikh e Saraf, 2017). Segundo Nahas et al. (1994), estudando micro-organismos solubilizadores de P, o número de fungos solubilizadores em termos relativos (30,2%) é superior ao de bactérias (16,4%). Os fungos filamentosos são ainda os estudados em maior escala para análises de solubilização de P, destaque para as espécies de *Penicillium* e *Aspergillus* (Whitelaw et al., 1999; Sharma et al., 2013). Contudo, esse estudo e os já mencionados reforçam que as leveduras também podem ser descritas como micro-organismos solubilizadores de fosforo (MSF) e micro-organismos solubilizadores de zinco (MSZ), promovendo maiores benefícios durante as interações com plantas, inclusive a promoção do crescimento vegetal.

O crescimento de plantas induzido pelas leveduras inoculadas em platas também pode indicar efeitos hormonais diretos. Alguns trabalhos mostraram que leveduras são micro-organismos capazes de produzir substâncias promotoras de crescimento, como hormônios, aminoácidos e vitaminas (Reed, et al., 1991; Mahadevam, 1984). Sendo assim, em busca de explorar características propícias a colonização e seleção das leveduras que ajudassem a entender a ecologia das interações capazes de auxiliar no estabelecimento da cana-de-açúcar, essa cultura nos seus ambientes de distribuição, analisou-se a capacidade das leveduras em sintetizar AIA, fitormônio pertencente ao grupo das auxinas, considerado um importante marcador do estabelecimento de associações simbióticas promotoras do crescimento vegetal.

Assim como as plantas, micro-organismos sintetizam o AIA. Frequentemente, a produção de auxinas é verificada pelo método *Salkowski*, e equivocadamente descrita como indicadora de AIA, como, por exemplo, nos trabalhos de Sun et al., (2014) e de Limtong e Koowadjanakul, (2012), que relataram uma (pseudo) “produção” de AIA em todas as leveduras isoladas da filosfera de *Drosera indica* L. e em aproximadamente 37,7% das isoladas do filoplano de várias espécies de plantas, respectivamente. Por conseguinte, de acordo com Glickmann e Dessaux (1994), a análise quantitativa do AIA por *Salkowski* não é possível, pois essa técnica não apenas detecta o AIA, mas também os outros compostos indólicos. Por isso, também adotou a denominação de compostos indólicos para designar o resultado da análise através da técnica colorimétrica de *Salkowski*.

Nesse estudo, todas as leveduras isoladas do colmo de cana-de-açúcar foram capazes de sintetizar compostos indólicos. As leveduras RBR1 (*Rhodotorula* sp. – 38,7 µg/mL), SPM10 (*Meyerozyma* sp. – 36,8 µg/mL) e SPC1 (*Candida* sp. – 27,2 µg/mL) foram as que quantitativamente mais produziram compostos indólicos, apesar de não se diferenciarem estatisticamente das demais leveduras. Interessantemente, dentre essas maiores produtoras de compostos indólicos, a RBR1 não se detectou a produção específica de AIA. Comportamento semelhante ocorreu também com outras leveduras da mesma espécie CBR2 e RBR3, e com leveduras de outra espécie RBC2 (*Candida* sp.) e SPM3, CBM5, CBM6, CBM8 e SPM9 (todas *Meyerozyma* sp.). Além disso, notou-se que a quantidade de compostos indólicos também variam quantitativamente

entre leveduras do mesmo clado. Dado claramente exemplificado pelo clado de *Meyerozyma* sp. cuja produção variou de 15,7 µg/mL pela levedura SPM4 a 36,7 µg/mL pela levedura SPM10 (a maior produtora de compostos indólicos). Essa diferença também foi constatada por outros pesquisadores (Ruanpanun et al., 2010; Limtong et al., 2014; Limtong e Koowadjanakul, 2012). Inúmeros fatores ambientais, valor de pH e temperatura, podem influenciar na síntese de AIA (Spaepen et al., 2007). Strzelczyk et al., (1992) relataram que os fungos micorrízicos preferem a biossíntese de auxinas em pH 6.0 - 9.0. Tendências semelhantes foram observadas nos fungos *Pleurotus ostreatus* (Bose et al., 2013) e *Nectria pterospermi* (Yu et al., 1970). Sun et al. (2014) e Gunasekaran (1997) sugerem que 28°C é a temperatura ótima para a produção de AIA. Apesar de as condições de cultivo (pH 6,0 a 30°C) das leveduras isoladas do colmo de cana-de-açúcar terem sido adequadas para a síntese de compostos indólicos, houve variações quantitativas na produção entre as diferentes repetições experimentais gerando o alto desvio padrão. Essa dispersão dos dados indica que a produção de compostos indólicos pode variar dentro de uma mesma levedura.

O método de imunodeteção através de um anticorpo monoclonal anti-AIA foi capaz de detectar, especificamente, a síntese AIA pelas leveduras caracterizadas nesse trabalho. O AIA são os compostos que têm maior efeito positivo no crescimento de plantas e o mais estudado na relação de interação entre micro-organismos com efeitos sobre o crescimento de plantas, por isso o interesse em leveduras que sintetizem especificamente AIA. Apesar de todas as leveduras sintetizarem compostos indólicos, nem todas foram capazes de produzir o AIA. Como a levedura RBC2 do clado *Candida* sp., as leveduras SPM3, CBM5, CBM6 e SPM9 do *Meyerozyma* sp., e as leveduras RBR1, CBR2 e RBR3 do clado *Rhodotorula* sp.. Salientando que as leveduras SPR4 (*Rhodotorula* sp.) e SPC1 (*Candida* sp.) foram as que mais produziram AIA, 806,49 pM/mL e 655,22 pM/mL, respectivamente, embora a levedura SPR4 tenha tido, quantitativamente, a menor produção de compostos indólicos totais, 8,7 µg/mL.

Dutra (2016) verificou que a levedura *Y. lipolytica* era capaz de sintetizar compostos indólicos e Cogo e colaboradores (2018) comprovaram a síntese de AIA. Estes dados anteriormente descritos por esse grupo de pesquisa somados

aos deste trabalho ressaltam a relevância desta, dentre outras características bioquímicas das leveduras, para a promoção do crescimento vegetal.

É muito comum que os testes para análise de compostos indólicos sejam feitos na ausência e na presença de triptofano, precursor na síntese de AIA. No caso de leveduras, estudos têm sugerido que a via independente de Trp existe em muitas espécies de leveduras (Rao et al., 2010). Esse trabalho demonstrou que todas as leveduras capazes de produzir AIA foram independentemente de triptofano. Embora Nakayan e colaboradores (2013) tenham demonstrado a capacidade das espécies *R. mucilaginosa* (do gênero *Rhodotorula*), *M. caribbica* e *M. guilliermondii* (ambas do gênero *Meyerozyma*) na produção de compostos indólicos, na ausência do triptofano; Xin et al., (2009), não a detectaram na ausência de triptofano, em três espécies de levedura (*R. glutinis*) também do gênero *Rhodotorula*, enquanto Limtong e colaboradores (2015), mesmo na presença triptofano, não detectaram a produção de compostos indólicos na levedura *R. Mucilaginosa* (do gênero *Rhodotorula*) e *M. caribbica* (do gênero *Meyerozyma*). Esse conjunto indica fortemente a individualidade de cada levedura, especificamente de cada isolado, mesmo que pertençam ao mesmo gênero e/ou mesma espécie.

Em vista de todos os dados discutidos nesse trabalho, é notável a importância dos estudos que desmonstrem o potencial das interações leveduriformes e seus efeitos benéficos. De fato, desde Nassar e colaboradores (2005) demonstraram pela primeira vez o potencial de uma levedura associada endofiticamente à raiz de milho, *Williopsis saturnus*, em promover o crescimento vegetal pela produção de compostos indólicos, as leveduras simbiontes têm recebido um crescente reconhecimento quanto à importância destas interações na regulação do crescimento vegetal. Outro exemplo é a levedura *C. tropicalis* que estimulou o crescimento de mudas de arroz (Amprayn et al., 2012) e quando inoculada em plantas de milho reduziu a dose de aplicação de fertilizantes químicos devido à produção de compostos indólicos, além de aumentar o desempenho de crescimento e produtividade desta cultura (Mukherjee e Sen, 2015).

Outro ponto interessante da associação de fungos, é a capacidade de promover a adaptabilidade a vários estresses abióticos como temperatura, pH e pressão osmótica, além de estresses bióticos (Rodriguez et al., 2008). Foi

demonstrado por Waqas e colaboradores (2012) a habilidade dos fungos *Phoma glomerata* LWL2 e *Penicillium* sp. LWL3 em secretarem AIA durante a simbiose reduzindo a toxicidade do sódio em condições de estresse salino e ainda promovendo o aumento da biomassa da planta. O valor genético modulador dessas associações simbióticas foi demonstrado quando plantas de tomate e melancia foram capazes de sobreviver a temperaturas de 50°C a 65°C após inoculação com o fungo endossimbiótico *Curvularia* sp. (Marquez et al., 2006). Essas espécies de fungos são simbióticas a grama *Dichanthelium lanuginosum* e permitem a sobrevivência de ambos os organismos no solo do Parque Nacional de Yellowstone com altas temperaturas. Interessantemente, caso cultivadas separadamente, nem o fungo nem a planta é capaz de crescer a temperaturas acima de 38°C (Redman et al., 2002).

Até hoje, o melhoramento de plantas para resistência aos estresses abióticos e bióticos, dependem em grande parte da manipulação de genomas das plantas, quer seja por hibridizações dirigidas quer seja por modificação genética. No entanto, evidências crescentes indicam que a função dos micro-organismos simbióticos representa um enorme reservatório genético natural com grande potencial para melhorar mais rapidamente e de forma mais segura o desempenho dos germoplasmas das plantas cultiváveis (Hart et al., 2005; Strobe, 2006; Barrow et al., 2008). Portanto, leveduras transferidas de geração em geração, encontradas nas mais diferentes variedades de plantas e condições de cultivo, são micro-organismos que se tornam uma alternativa estratégica em substituição aos fertilizantes químicos usados na promoção do crescimento vegetal, podendo ainda auxiliar na adaptação das plantas aos diferentes estresses ambientais.

Neste contexto, é importante enfatizar que os efeitos de inoculação de plantas com fungos variam enormemente com as espécies em interação. Por exemplo, a interação da levedura *Ustilago esculenta* estimulou a formação da raiz lateral, mas inibiu o alongamento da raiz primária em *Arabidopsis* (Sun et al., 2014) e, por contraste, a levedura estimulou a formação radicular lateral e promoveu alongamento da raiz primária em *Nicotiana benthamiana* (Fu et al., 2016). Portanto, estudos como o que empreendemos, visando isolar e caracterizar leveduras/cepas colonizadoras usuais da própria cultura, dotadas com características de ecoadaptação, são repositórios de dados extremamente

relevantes para futuras incursões no desenvolvimento de inóculos de leveduras promotoras do crescimento vegetal.

Com base nos dados analisados, as leveduras SPM4 e SPM10 pertencentes ao clado das *Meyerozyma* sp., e as RBR1 e SPR4 pertencentes ao clado das *Rhodotorula* sp. seriam as leveduras mais promissoras para a investigação de futuros trabalhos visando à interação entre levedura e plantas, incluindo a análise do potencial dessas leveduras no desenvolvimento de bioinóculos eficazes em promover a melhoria da produtividade agrícola. Todas essas leveduras foram consideradas ácido-resistentes e alumínio-resistentes, portanto seriam capazes de sobreviver em ambientes caracterizados por estas condições de estresse físico: solos ácidos associados à toxicidade do alumínio. Há indícios de que as leveduras SPM4 e SPM10 possam atuar disponibilizando nutrientes, fosfato e zinco, para as plantas, pois in vitro foi detectado sua capacidade de fazê-lo. A levedura RBR1 teve o maior quantitativo de produção de compostos indólicos, apesar da ausência de produção do AIA, enquanto a SPM10 também tem grande quantidade de compostos indólicos, porém a produção de AIA foi menor do que outras leveduras, tais como a das leveduras SPM4 e SPR4 que produziram a maior quantidade de AIA dentre as demais leveduras.

Em vista disso, os benefícios induzidos por uma mistura de leveduras pode indicar uma interação sinérgica entre elas. Elas podem adaptar-se a uma gama mais ampla de condições ambientais e podem possuir diferentes modos de colonizar sementes, folhas ou raízes. Assim como já descrito em outros estudos e ensaios de campo, mostrando que inoculantes contendo uma mistura de espécies promovem efeitos benéficos maiores que os inoculantes de linhagem única (Cruz et al., 2019; Thomludi et al., 2019). Portanto, acredita-se que essas leveduras em conjunto, cada qual com sua performance biológica, poderiam atuar diretamente em prol do desenvolvimento vegetal. Além disso, o presente estudo integra um projeto maior que visa entender como a seleção e a dinâmica de populações específicas de leveduras, no decorrer da dispersão vegetal, contribuíram para o estabelecimento e desenvolvimento de culturas. Os dados compilados nesse trabalho sugerem que existe um grande campo aberto para se estudar as comunidades de leveduras associadas durante todo o processo de distribuição biogeográfica.

7. RESUMO E CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como objetivo isolar, identificar e caracterizar leveduras associadas ao colmo da cana-de-açúcar, tecidos de propagação vegetal em cultivos, analisando indicadores fisiológicos, bioquímicos e moleculares do potencial destas leveduras como promotoras do crescimento vegetal. A capacidade de produção de compostos indólicos e de solubilização de fósforo e zinco foi determinada, bem como o crescimento em condições de pH ácido e presença de alumínio. Vinte isolados de leveduras foram identificados por meio do sequenciamento da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) como pertencentes a quatro gêneros distintos: *Candida* sp. (3 leveduras), *Hanseniaspora* sp. (2 leveduras), *Meyerozyma* sp. (10 leveduras) e *Rhodotorula* sp. (5 leveduras). Os gêneros *Candida*, *Hanseniaspora* e *Meyerozyma* pertencem ao filo Ascomycota, enquanto que o gênero *Rhodotorula* ao filo Basidiomycota.

→ As sequências nucleotídicas obtidas na análise molecular quando confrontadas com banco de dados BLAST/NCBI caracterizaram as 20 leveduras isoladas como sendo espécies: *Candida* sp. (código SPC1), *Candida parapsilosis* (códigos RBC2 a RBC3), *Hanseniaspora vineae* (códigos RBH1 a RBH2), *Meyerozyma caribbica* (códigos CBM1 a CBM5), *Meyerozyma guilliermondii* (códigos CBM6 a SPM10) e *Rhodotorula mucilaginosa* (códigos RBR1 a SPR5).

→ Em geral, todas as leveduras descritas foram capazes de crescer bem sob estresse ácido, em especial as identificadas com os códigos SPC1, RBH1, CBM6 e SPM10 obtiveram o melhor crescimento em pH 3,0.

→ Todas as leveduras foram tolerantes à concentração de 0,5 mM e 1,0 mM de $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$.

→ A maioria das leveduras foi caracterizada como micro-organismos solubilizadores de fósforo (MSF), exceto as identificadas com os códigos RBH1, RBH2, RBR1 e RBR3 que correspondem aos gêneros *Hanseniospora* e *Rhodotorula*, respectivamente.

→ A maioria das leveduras foram caracterizadas como micro-organismos solubilizadores de zinco (MSZ), exceto as identificadas com os códigos RBR1, SPR4 e SPR5, todas do gênero *Rhodotorula* e com os códigos RBH1 e RBH2 do gênero *Hanseniospora*.

→ A levedura *C. parapsilosis* (código RBC3) foi o isolado com maior eficiência em solubilizar P.

→ As leveduras das espécies *M. guilliermondii* (código SPM9 e SPM10) foram os isolados com maior eficiência de solubilizar Zn.

→ Todas as leveduras descritas foram capazes de sintetizar compostos indólicos sendo os isolados SPM10 e RBR1 os que tiveram a produção mais significativa de compostos.

→ A levedura isolada SPR4, espécie *Rhodotorula mucilaginosa*, foi a que produziu AIA em maior concentração (806,49 pM/mL), apesar de a média da produção total de compostos indólicos não ter sido a mais significativa.

→ A levedura RBR1, foi a que mais produziu compostos indólicos (38,69 µg/mL), no entanto, não se detectou qualquer presença de AIA.

→ O isolado SPC1 (*Candida sp.*), mostrou-se a mais promissora em termos de versatilidade do potencial promotor do crescimento vegetal, pois foi eficiente em solubilizar P e Zn, tolerar ambientes ácidos e com alumínio, e por sintetizar AIA, compreendendo assim todas as principais características marcadoras testadas.

→ Os dados aqui obtidos com isoladas de três híbridos interespecíficos de canas derivadas de três programas de melhoramento extremamente distintos no tempo e no espaço, em conjunto com dados sobre a presença de espécies semelhantes em canas distribuídas em vários países, remontando as origens biogeográficas das espécies parentais, permitem defender a tese de uma provável existência de uma ligação ancestral de algumas destas leveduras no que

tange à capacitação para a adaptabilidade aos diferentes nichos em que a cultura canavieira se estabeleceu ao longo de seu histórico agrônomo.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilera, P., Larsen, J., Borie, F., Berríos, D., Tapia, C., Cornejo, P. (2018). New evidences on the contribution of arbuscular mycorrhizal fungi inducing Al tolerance in wheat. *Rhizosphere*, 5:43-50.
- Ahn, S. J., Matsumoto, H. (2006) The role of the plasma membrane in the response of plant roots to aluminum toxicity. *Plant Signal Behav.* 1:37-45.
- Alexander M (1977) Introduction to soil microbiology. Wiley, New York.
- Alikhani, H. A.; Saleh-Rastin, N.; Antoun, H. (2006) Phosphate solubilization activity of rhizobia native to Iranian soils. *Plant and Soil*, The Hague. 287:35-41.
- Al-Falih, A. M., Wainwright, M. (1995) Nitrification, S oxidation and P-solubilization by the soil yeast *Williopsis californica* and by *Saccharomyces cerevisiae*. *Mycological Research*. 99:200-204.
- Al-Falih, A. M. (2005) Phosphate Solubilization in Vitro By Some Soil Yeasts. *Qatar Univ. Sci. J.* 25:119-125.
- Almeida, J., Ernani, P. R. and Maçaneiro, K. C. (1999) Recomendação alternativa de calcário para solos altamente tamponados do extremo sul do Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria. 29(4):651-656.
- Aly, A. H., Debbab, A., Kjer, J., Proksch, P. (2010) Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. *Fungal Divers.*, 41(1):1-16.

- Alonso, L. M., Kleiner, D., Ortega, E. (2008) Spores of the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* host yeasts that solubilize phosphate and accumulate polyphosphates. *Mycorrhiza*. 18:197-204.
- Alloway, B. J. (2004) Zinc in soils and crop nutrition. International Zinc Association, Brussels, Belgium.
- Alori, E. T., Glick, B. R., e Babalola, O. O. (2017). Microbial Phosphorus Solubilization and Its Potential for Use in Sustainable Agriculture. *Frontiers in Microbiology*. 8:971.
- Amprayn, K., Rose, M. T., Kecskés, M., Pereg, L., Nguyen, H. T., Kennedy, I. R. (2012) Plant growth promoting characteristics of soil yeast (*Candida tropicalis* HY) and its effectiveness for promoting rice growth. *Applied Soil Ecology*. 61:295-299.
- Anastassiadis, S., Morgunov, I., Kamzolova, S., eFinogenova, T. (2008). Citric Acid Production Patent Review. *Recent Patents on Biotechnology*. 2(2):107-123.
- Adesemoye, A. O., Yuen, G., e Watts, D. B. (2017). Microbial Inoculants for Optimized Plant Nutrient Use in Integrated Pest and Input Management Systems. *Probiotics and Plant Health*. 21-40.
- Antoun, H. (2012) Beneficial microorganisms for the sustainable use of phosphates in agriculture. *Procedia Eng*. 46:62-67.
- Arbefeville, S., Harris, A., Ferrieri, P. (2016) Comparison of Sequencing the D2 Region of the Large Subunit Ribosomal RNA Gene (MicroSEQ®) Versus the Internal Transcribed Spacer (ITS) Regions Using Two Public databases for Identification of Common and Uncommon Clinically Relevant Fungal Species. *ASM Microbe*. 16-20.
- Aremu, D. A., Meshitsuka, S. (2006) Some aspects of astroglial functions and aluminium implications for neurodegeneration. *Brain Res Rev*. 52:193-200.
- Aréchiga-Carvajal, E., Ruiz-Herrera, J. (2005) The RIM101/pacC homologue from the basidiomycete *Ustilago maydis* is functional in multiple pH-sensitive phenomena. *Eukaryot. Cell* 4:999-1008.

- Anderson, I., Cairney, J. (2004) Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environmental Microbiology*. 6 (8): 769-779.
- Amorin, S. S. (2014) Isolamento e Caracterização de Leveduras com Potencial para a Biorremediação do Manganês. Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto. Minas Gerais - MG
- Ahn, S. J., Sivaguru, M., Chung, G. C., Rengel, Z. and Matsumoto, H. (2002) Aluminium-induced growth inhibition is associated with impaired efflux and influx of H^+ across the plasma membrane in root apices of squash (*Cucurbita pepo*). *Journal of Experimental Botany*, 53(376):1959-1966.
- Aguilera, A. (2013) Eukaryotic organisms in extreme acidic environments, the Río Tinto case, *Life* (Basel, Switzerland), 3:363-374.
- Avery, S.V. (2001) Metal toxicity in yeasts and role of oxidative stress. *Adv. Appl. Microbiol.* 49:111-142.
- Bacon, C. W., Hinton, D. M. (2002) Endophytic and biological control potential of *Bacillusmojavensis* and related species. *Biol Cont.* 23:274-84.
- Bab'eva, I., Belyanin, A. I. (1966) Yeasts of the rhizosphere. *Mikrobiologiya* 35:712-720.
- Bakker, P. A . H . M., Berendsen, R. L., Doornbos, R. F., Wiermants, P. C. A., Pieterse, C. M. J. (2013) The rhizosphere revisited: root microbiomics. *Frontiers in Plant Science|Plant-Microbe Interaction*. 4(165):1-7.
- Baldani, J. I.; Rei, S. V. M.; Baldani, V. L. D., Dobereiner, J. (2002) A brief story of nitrogen fixation in sugarcane - reasons for success in Brazil. *Functional Plant Biology*.29: 147-423.
- Balestrini, R., Lumini, E. (2018) Focus on mycorrhizal symbioses. *Applied Soil Ecology*. 123:299–304.
- Banerjee, A., Bareh, D.A. and Joshi, S.R. (2017) Native microorganisms as potent bioinoculants for plant growth promotion in shifting agriculture (*Jhum*) systems. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 17 (1), 127-140.

- Barceló, J., Poschenrieder, C. (2002) Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. *Environ. Exp. Bot.* 48:75-92.
- Barber, C, A. (1920) The origin of the sugar cane. *The International Sugar Journal*.22:249-251.
- Barber, C. A. (1922) The classification of Indian Canes. *The International Sugar Journal*24:18-20.
- Bashan, Y., De-Bashan, L.E., Prabhu, S.R., Hernandez, J-P. (2014) Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology-formulations and practical perspectives. *PlantSoil* (1998– 2013). *PlantSoil*, 378:1–33.
- Barroti, G. e Nahas, E. (2000) População microbiana total e solubilizadora de fosfato em solo submetido a diferentes sistemas de cultivo. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília. 35(10):2043-2050.
- Barroso, C. B. eNahas, E. (2008) Solubilização do fosfato de ferro em meio de cultura. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 43:529-535.
- Ben-Jacob, E., Finkelshtein, A., Ariel, G., eIngham, C. (2016). Multispecies Swarms of Social Microorganisms as Moving Ecosystems. *Trends in Microbiology*. 24(4):257-269.
- Berg, G. (2009) Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Appl Microbiol Biotechnol.* 84:11-18.
- Berg, G., Rybakova, D., Grube, M., and Koberl, M. (2016). The plant microbiome explored: implications for experimental botany. *J. Exp. Bot.* 67:995–1002.
- Bertin, C., Yang, X. eWesron, A. (2003) The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant and Soil.* 256: 67-83.
- Berovic, M. and Legisa, M. (2007) Citric acid production. *Biotechnol. Annu. Rev.* 13:303-343.
- Boivin, N. L., Zeder, M. A., Fuller, D. Q., Crowther, A., et al., (2016) Ecological consequences of human niche construction: examining long-term anthropogenic shaping of global species distributions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113:6388-6396.

- Bose, A., Shah, D., Keharia, H. (2013) Production of indole-3- acetic-acid (IAA) by the white rot fungus *Pleurotusostreatus* under submerged condition of Jatropha seedcake. *Mycology*.4:103-111.
- Bose, J., Babourina, O., eRengel, Z. (2011). Role of magnesium in alleviation of aluminium toxicity in plants. *Journal of Experimental Botany*. 62(7):2251-2264.
- Bohn, H.; McNeal, B. L. eO'ConnoR, G. A. (1985) Salt-afected soils. In: Bohn, H.; McNeal, B. L. e O'Connor, G. A. *Soil Chemistry*. New York, Willey Interscience Publication. 234-261.
- Brady, N., and R. Weil. (2002) *The nature and properties of soils*. Pearson Education, Inc., Upper Saddle River, NJ
- Beulah Jerlin, S. Sharmila, K. Kathiresan, K. Kayalvizhi. (2017) Zinc Solubilizing Bacteria from Rhizospheric Soil of Mangroves. *International. Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2(3):148-155.
- Bowen, G. D. eRovira, A. D. (1991) The rhizosphere. In: Waisel, Y., Eshal, A. e Kafkat, U. (Eds.) *Plant Roots*. New York. Marcel Dekker. 641-669.
- Bonkowski, M., Villenave, C., and Griffiths, B. (2009). Rhizosphere fauna: the functional and structural diversity of intimate interactions of soil fauna with plant roots. *Plant Soil*. 321:213-233.
- Breurec, S., Guillard, B., Hem, S., Brisse, S., et al., (2011) Evolutionary history of *Helicobacter pylori* sequences reflect past human migrations in Southeast Asia. *PLoS One*. 6:e22058.
- Broadley, M. R., White, P.J., Hammond, J.P., Zelko, I., Lux, A. (2007) Zinc in plants. *New Phytologist*. 173:677-702.
- Bunemann, E.K., Prusisz, B., Ehlers, K. (2011) Characterization of phosphorus forms in soil microorganisms. In: Bunemann, E., Oberson, A., Frossard, E. (eds) *Phosphorus in action: biological processes in soil phosphorus cycling*. *Soil biology*.vol 26. Springer, Heidelberg.
- Burgstaller, W., Schinner, F. (1993) Leaching of metals with fungi. *Journal of Biotechnology*. 27:91-116.
- Bünemann, K., Bongiorno, G., Bai, Z., Creamer, R. E. (2018) Soil quality – A critical review. *Soil Biology and Biochemistry*. 120:105-125.

- Butinar, L., Santos S., Spencer-Martins, I., Oren, A., Gunde-Cimerman, N. (2005) Yeast diversity in hypersaline habitats. *FEMS Microbiology Letters*. 244:229-234.
- Bai F. Y., Liang H. Y., Jia J. H., (2000) Taxonomic relationships among the taxa in the *Candida guilliermondii* complex, as revealed by comparative electrophoretic karyotyping. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 417-422.
- Bullock, J. M., Bonte, D., Pufal, G., da Silva Carvalho, C. et al., (2018). Human-Mediated Dispersal and the Rewiring of Spatial Networks. *Trends in Ecology e Evolution*. 1-13.
- Bellemain, E., Carlsen, T., Brochmann, C. et al. (2010) ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an *in silico* approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiol* 10:189
- Bennett, J .E. (1990) Searching for the yeast connection. *N Engl. J. Med.* 323(25):1766-7.
- Boekhout T, Kurtzman CP, O'Donnell K e Smith MT (1994) Phylogeny of the yeast genera *Hanseniaspora* (anamorph *Kloeckera*), *Dekkera* (anamorph *Brettanomyces*), and *Eeniella* as inferred from partial 26S ribosomal DNA nucleotide sequences. *Int. J. Syst. Bacterial.* 44: 781-786
- Barceló, J., Poschenrieder, Ch; Vázquez, M.D., et al. (1996) Aluminum phytotoxicity. *Fertilizer Research, The Hague*, 43:217-223.
- Bateman, D. F. and Beer, S. V. (1965) Simultaneous production and synergistic action of oxalic acid and polygalacturonase during pathogenesis by *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*, 58:204-211.
- Barrow, N. J. (2016). The effects of pH on phosphate uptake from the soil. *Plant and Soil*, 410(1-2): 401-410.
- Caniato, F. F., Guimarães C. T., Schaffert R. E., Alves, V. M. et al., (2007) Genetic diversity for aluminum tolerance in sorghum Genetic diversity for aluminum tolerance in sorghum. *Theor Appl Genet.* 114:863-876.
- Chai, B., Wu, Y., Liu, P., Liu, P. and Gao, M. (2011) Isolation and phosphate-solubilizing ability of a fungus, *Penicillium sp.* from soil of an alum mine. *Journal of Basic Microbiology.* 51:5-14.

- Cho, I. e Blaser, M. J. (2012) The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat. Rev. Genet.* 13:260-270.
- Chao, W., Xue-Qiang, Z., Aizawa, T., Sunairi, M, and Ren-Fang, S. (2013) High Aluminum Tolerance of *Rhodotorula sp.* RS1 is Associated with Thickening of the Cell Wall Rather than Chelation of Aluminum Ions, *Pedosphere* 23(1):29-38.
- Chanclud, E. and Morel, J. B. (2016) Review Plant hormones: a fungal point of view. *Molecular Plant Pathology.* 17(8):1289-1297.
- Chung, K. R. and Tzeng, D. D. (2004) Biosynthesis of indole-3-acetic acid by the gall-inducing fungus *Ustilago esculenta*. *J. Biol. Sci.* 4:744-750.
- Chung, K. R., Shilts, T., Erturk, U., Timmer, L. W. and Ueng, P. P. (2003) Indole derivatives produced by the fungus *Colletotrichum acutatum* causing lime anthracnose and postbloom fruit drop of citrus. *FEMS Microbiol. Lett.* 226:23-30.
- Cogo, A. J. D., Dutra, K.R.F., Lev. A. Okorokov, Ramos, A.C., Façanha, A. R., Okorokov, L. A., Okorokova-Façanha, A. L. (2018) Spermine modulates fungal morphogenesis and activates plasma membrane H⁺-ATPase during yeast to hyphae transition. *Biol Open.* 20;7(2):1-13.
- Compant, S., Samad, A., Faist, H., eSessitsch, A. (2019). A review on the plant microbiome: Ecology, functions and emerging trends in microbial application. *Journal of Advanced Research.* 29-37.
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar - V. 5 - Safra 2018/19 N.4 - Quarto levantamento | Abril 2019 - Acompanhamento Da Safra Brasileira - Cana-de-açúcar
- Cloete, K. J., Valentine, A.J., Stander, M.A., Blomerus, L.M., Botha, A. (2009) Evidence of Symbiosis Between the Soil Yeast *Cryptococcus laurentii* and a Sclerophyllous Medicinal Shrub, *Agathosmabetulina* (Berg.) Pillans. *Microbial Ecology.* 57(4):624-632.
- Coutinho, F. P. e Houllou, L. M. (2016) Solubilização de fosfato por fungos isolados da rizosfera de cana-de-açúcar (*Saccharum spp. L.*). XII Semana de Biologia II Workshop de Micologia.

- Carroll, F., Karen, C., Butel, Janet, S., Morse, Stephen A., Timothy A. Miet
Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick e Adelberg (2014) Autor: Brooks,
Geo. - 26.ed - 1ª edição, publicada em 1954.
- Cesnik, R. (2007) Melhoramento da cana-de-açúcar: março sucro-alcooleiro no
Brasil. Acessado em: 22 de fevereiro de 2020. Disponível em:
<http://www.cnpma.embrapa.br/public/index.php3?it=peid=131efunc=public>.
- Caballero, N. (2020) Acessado em: 22 de fevereiro de 2020.
- Disponível em: <https://www.novacana.com/n/internacional/acucar/dependencia-acucar-tailandia-poluicao-diabetes-280219>
- Disponível em:
<https://www.novacana.com/n/internacional/acucar/pior-seca-em-40-anos-devasta-plantacoes-cana-de-acucar-tailandia>.
- Cunha, G. O. M., Almeida, J. A., Testoni, S. A., Barboza, B. B. (2015) Formas de
Alumínio em Solos Ácidos Brasileiros com Teores Excepcionalmente Altos de
Al³⁺ Extraível com KCl. Revista Brasileira de Ciência do Solo, 39:1362-1377
- Caddick, M. X., Brownlee, A. G., Arst, H. N. Jr (1986) Regulation of gene
expression by pH of the growth medium in *Aspergillus nidulans*. Mol. Gen.
Genet. 203(2):346-353.
- Cruz, R. S., Araújo, F. H. V., França, A. C., Graziotti, P. H. (2019) Crescimento
pós-plantio de cultivares de *Coffea arabica* inoculadas com fungos micorrízicos
arbusculares. Revista Craibeiras de Agroecologia, 4(1):e8059.
- de Albuquerque, A. W. Sá, L. A., Rodrigues, W. A. R., Moura, A. B. e Oliveira
Filho, M. S. (2016) Crescimento e produtividade da cana-de-açúcar em função
de doses e formas de aplicação de fósforo. Rev. Bras. Eng. Agríc. Ambient.
[online]. 20(1):29-35.
- de Azeredo L. A. I., Gomes, E. A. T. G., Mendonça-Hagler, L. C. and Hagler, A.
N(1998) Yeast communities associated with sugarcane in Campos, Rio de
Janeiro, Brazil Internatl Microbiol. 1:205-208.
- de Carvalho Neto, D., de Melo Pereira, G., Tanobe, V., Thomaz Soccol, V., G. da
Silva, B., Rodrigues, C., e Soccol, C. (2017). Yeast Diversity and

Physicochemical Characteristics Associated with Coffee Bean Fermentation from the Brazilian Cerrado Mineiro Region. *Fermentation*. 3(1):11.

Daniels, J. e B. T. Roach. (1987) Taxonomy and evolution. Pages 7-84 in *Sugarcane Improvement through Breeding*. Edited by D.J. Heinz. Elsevier Press, Amsterdam.

Daniels, J. e Daniels, C. (1993) Sugarcane in Prehistory. *Archaeologia Oceania*. 28:1-7.

Dennis, P. G., Miller, A. J., Hirsch, P. R. (2010) Are root exudates more important than other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities? *FEMS Microbiol Ecol*. 72:313-327.

Delic, M., Valli, M., Graf, A. B., Pfeffer, M., Mattanovich, D., e Gasser, B. (2013). The secretory pathway: exploring yeast diversity. *FEMS Microbiology Reviews*. 37(6):872-914.

Delhaize, E. and Ryan, P. R. (1995) Aluminum Toxicity and Tolerance in Plants. *Plant Physiology*. 107(2):315-321.

Deak, T. (n.d.). (2006). Environmental Factors Influencing Yeasts. Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. In: Péter, G., e Rosa, C. (Eds.). Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. *The Yeast Handbook*. 155-174.

Do Carmo, S. L. (1969) Distribution of yeasts in nature. In: Rose AH, Harrison JS (eds) *The yeasts*, vol 1, 1st edn. Academic Press, New York. 79-105.

Dujon, B. Yeast evolutionary genomics. n. 1471-0064 (Electronic), 2010.

D'Hont, A., Souza, G. M, Menossi, M., Vicentz, M. et al., (2008) Sugarcane: A Major Source of Sweetness, Alcohol, and Bio-energy. P.H. Moore, R. Ming (eds.), *Genomics of Tropical Crop Plants* Chapter 21pp 483-413.

Du Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*. 196:3-14.

Doran, J. W. e Parkin, T. B. Defining and assessing soil quality. In: Doran, J. W.; Coleman, D. C.; Bezdicsek, D. F. e Stewart, B. A., eds. *Defining soil quality for a sustainable environment*. Madison, SSSA, 1994. p.1-20. (Special, 35).

- De Souza, R., Ambrosini, A., Passaglia, L. M. P. (2015) Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology*. 38(4):401-419.
- Da Silva, C. F., Vitorino, L. C., Soares, M. A., Souchie, E. L. (2018) Multifunctional potential of endophytic and rhizospheric microbial isolates associated with *Butiapurpurascens* roots for promoting plant growth. *Antonie van Leeuwenhoek*. 111:2157-2174.
- Da Silva, J. C. (2017) Tecnologias para produção de mudas de cana-de-açúcar. Dissertação apresentada no Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias – Agronomia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde – Área de Concentração Tecnologias Sustentáveis em sistemas de produção e uso do solo e água.
- Dutra, K. R. (2016) Modulação da transição dimórfica de *Yarrowialipolytica*. Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) – Campos dos Goytacazes/RJ.
- Duante, A. W. F. (2015) Biodiversidade de leveduras derivadas de ecossistemas Antárticos marinhos e terrestres e propescção de lipases. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT. São Paulo - SP.
- Denison, S. H. (2000) pH regulation of gene expression in fungi. *Fungal Genet Biol*, 29:61-71.
- Davis, D. A. (2009) How human pathogenic fungi sense and adapt to pH: the link to virulence. *Current opinion in microbiology*, 12(4):365-370.
- De Marco, L., Epis, S., Capone, A., Martin, E., Bozic, J., Crotti, E. et al. (2018). The Genomes of Four *Meyerozyma caribbica* isolates and Novel Insights into the *Meyerozyma guilliermondii* Species Complex. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 8(3):755-759.
- Diaz MR, Fell JW (2000) Molecular analysis of ITS and IGS rDNA regions of the psychrophilic yeasts in the genus *Mrakia*. *Antonie van Leeuwenhoek* 77:7-12.

- De Bernardis, F.; Mühlischlegel, F.A.; Cassone, A.; Fonzi, W.A. (1998) The pH of the host niche controls gene expression in and virulence of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 66:3317-3325.
- Davis, D. J., Edwards, E., Mitchell, A. P. and Ibrahim, A. S. (2000) *Candida albicans* RIM101 pH response pathway is required for host-pathogen interactions. *Infect. Immun.* 68:5953-5959.
- Davis, D., Wilson, R. B. and Mitchell, A. P (2000) RIM101 Dependent and Independent pathways govern pH responses in *Candida albicans*. *Mol. Cell. Biol.* 20(3): 971-978.
- Echart, L. E. e Avalli-Molina, S. (2001) Fitotoxicidade do alumínio: efeitos, mecanismo de tolerância e seu controle genético aluminumphytotoxicity: effects, tolerancemechanismsand its geneticcontrol. *Ciência Rural*, Santa Maria. 31(3):531-541.
- Edgar, R. C. (2013) UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat. Methods.* 10:996-998.
- Eklund, D.M., Thelander, M., Landberg, K., Staldal, V. et al., (2010) Homologues of the *Arabidopsis thaliana* SHI/STY/LRP1 genes control auxin biosynthesis and affect growth and development in the moss *Physcomitrella patens*. *Development.* 137:1275-1284.
- El-Mehalawy, A. A., Hassanein, N. M., Khater, H. M., El-Zahraa, A., El-Din, K., Youssef, A. Y. (2014) Influence of Maize Root Colonization by the Rhizosphere Actinomycetes and Yeast Fungi on Plant Growth and on the Biological Control of Late Wilt Disease. *International Journal of Agriculture and Biology.* 6(4): 599-605.
- 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.
- Esteve-Zarzoso, B., Peris-Torán, M.J., Ramón, D. et al. (2001). Molecular characterisation of *Hanseniaspora* species. *Antonie Van Leeuwenhoek* 80, 85-92 .

- Edgar, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, v.32, p.1792-1797, 2004.
- EPE Empresa de Pesquisa Energética (2017) Plano Decenal de Expansão de Energia 2026 / Ministério de Minas e Energia. Empresa de Pesquisa Energética. Brasília: MME/EPE.
- Emami, S., Alikhani, H. A., Pourbabaei, A. A., Etesami, H., Sarmadian, F., eMotessharezadeh, B. (2019). Assessment of the Potential of Indole-3-Acetic Acid Producing Bacteria to manage Chemical Fertilizers Application. *International Journal of Environmental Research*.
- Ezaki, B., Gardner, R.C., Ezaki, Y., Kondo, H., e Matsumoto, H. (1998) Protective roles of two aluminum (Al) induced genes, *HSP150* and *SED1* of *Saccharomyces cerevisiae*, in Al and oxidative stresses. *FEMS Microbiol. Lett.*, 159:99-105.
- Faeth, S. H and Fagan, W. F. (2002) Fungal Endophytes: Common Host Plant Symbionts but Uncommon Mutualists. *Integ and Comp Biol.* 42:360-368.
- Fazli, M. M., Soleimani, N., Mehrasbi, M., Darabian, S., Mohammadi, J. and Ramazani, A. (2015) Highly cadmium tolerant fungi: their tolerance and removal potential. *Journal of Environmental Health Science e Engineering*, 13:1-19.
- Famoso, A. N., Clark, R. T., Shaff, J. E., Craft, E., McCouch, S. R., eKochian, L. V. (2010). Development of a Novel Aluminum Tolerance Phenotyping Platform Used for Comparisons of Cereal Aluminum Tolerance and Investigations into Rice Aluminum Tolerance Mechanisms. *PlantPhysiology*. 153(4):1678-1691.
- Ferreira, F. P. (2002). Promoção de crescimento de plântulas micro-propagadas de cana-de-açúcar (Híbridos interespecíficos de *Saccharum*) por bactérias diazotróficas endofíticas. Dissertação de Mestrado apresentada na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) – Campos dos Goytacazes/RJ.
- Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Fell, J. W., Boekhout, T., Fonseca, A., Scorzetti, G., Statzell-Tallman, A. (2000) Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-

subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. — International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 50: 1351-1371.

Fell, J. W., Statzell-Tallman, A. (1998) *Rhodotorula* F.C. Harrison. In Kurtzman CP, Fell JW (eds) The Yeasts, a Taxonomic Study. 4th edn., pp. 800-827. Elsevier, Amsterdam.

Fell JW, Blatt G (1999) Separation of strains of the yeasts *Xanthophyllomyces dendrorhous* and *Phaffia rhodozyma* based on rDNA, IGS and ITS sequence analysis. J Ind Microbiol Biotechnol 21:677-681

Fan M, Chen LC, Ragan MA, Gutell R, Warner JR, Currie BP, Casadevall A (1995) The 5S rRNA and the RNA intergenic spacer of the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. J Med Vet Mycol 33:215-221

Ferreira, L.C.S. (2009) Caracterização da bioenergética da cana de açúcar. Tese apresentada na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) – Campos dos Goytacazes/RJ.

Ferreira, M. E.; Grattapaglia, D. (1998). Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3^a ed. Brasília:EMBRAPA-CENARGEN, 220p.

Fernandes de Melo, Hélio (2006) Resposta ao estresse ácido em leveduras da fermentação alcoólica industrial. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife/PE.

Finkel, O. M., Castrillo, G., Paredes, S. H., González, I. S. and Dangl, L. D. (2017) Understanding and exploiting plant beneficial microbes. Current Opinion in Plant Biology. 38:155-163.

Forzza, R. C., Baumgratz, J. F. A., Bicudo, C. E. M., Canhos, D. A. L. et al., (eds.). 2010. Catálogo de plantas e fungos Rodriguésia 66(4): 1033-1045. (2015) do Brasil. 2 vols. Andrea Jakobsson Estúdio / Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. p.1699.

Fontes, M. P. F., Weed, S. B. (1996) Phosphate adsorption by clays from Brazilian oxisols: relationships with specific surface area and mineralogy. Geoderma. 72:37-51.

- Frossard, E., Achat, D. L., Bernasconi, S. M., Bünemann, E. K., et al., (2011). The use of tracers to investigate phosphate cycling in soil-plant systems. In: Bünemann, E.K., Oberson, A., Frossard, E. (Eds.), Phosphorus in Action. Biological Processes in Soil Phosphorus Cycling. Springer, Heidelberg, pp. 59-91.
- Fu, S-F., Sun, P-F., Lu, H-Y, Wey, J-Y., Xiao, H-S., Falg, W-T., Cheng, B-Y., Chou, J-Y. (2016) Plant growth-promoting traits of yeasts isolated from the phyllosphere and rhizosphere of *Drosera spatulata* Lab. Fungal Biology. 120:433-448.
- Furlani, A.M.C. Eficiência de aproveitamento de nutrientes pelas plantas. Piracicaba, ESALQ/USP, 1988 (Curso de Pós-Graduação em Agronomia). 35p.
- Fell, J.W., Boekhout, T., Fonseca, A., Scorzetti, G., Statzell-Tallman, A. (2000) Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. Int J Syst Evol Microbiol 50:1351-137.
- Fonseca, A. e Inacio, J. (2006) Phylloplane yeasts. In: G. Peter, C. A. Rosa (eds.). Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. Berlin: Springer-Verlag
- Façanha, A. R. and Okorokova-Façanha, A. L. (2002). Inhibition of phosphate uptake in corn roots by aluminum-fluoride complexes. Plant Physiol. 129: 1763-1772.
- Fierer, N., and R. B. Jackson. (2006) The diversity and biogeography of soil bacterial communities. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:626-631.
- Fonzi, W. A. (1999) PHR1 and PHR2 of *Candida albicans* encode putative glycosidases required for proper cross-linking of beta-1,3- and beta-1,6-glucans. J Bacteriol. Nov; 181(22):7070-7079.
- Figueiredo, P. (2010) Breve história da cana-de-açúcar e do papel do Instituto Agrônomo. p.31-46. In: Dinardo-Miranda, L. L.; Vasconelos, A. C. M.; Landell, M. G. A. Cana-de-açúcar. 1º Ed. Campinas: Instituto Agrônomo, 882p.
- Ferreira, D. F. (2014). Sisvar: a guide for its bootstrap procedures in multiple comparisons. Ciencia E Agrotecnologia, 38(2):109-112.

- Garcia-Oliveira, A., Benito, C., Prieto, P., de Andrade Menezes, R., Rodrigues-Pousada, C., Guedes-Pinto, H., e Martins-Lopes, P. (2013) Molecular characterization of TaSTOP1 homoeologues and their response to aluminium and proton (H^+) toxicity in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Plant Biology*. 13(1):134.
- Garg, N. e Bhandari, P. (2013) Cadmium toxicity in crop plants and its alleviation by arbuscular mycorrhizal (AM) fungi: An overview. *Plant Biosystems*.
- Garg, S. K., Bhatnagar, A., Kalla, A., Narula, N. (2001) In vitro fixation, phosphate solubilization, survival and nutrient release by *Azotobacter* strains in aquatic system. *Bioresource Technology*. 80:101-109.
- Garzon, T., Gunse, B., Moreno, A. R., Tomos, A. D., Barceló, J., and Poschenrieder, C. (2011) Aluminium-induced alteration of ion homeostasis in root tip vacuoles of two maize varieties differing in Al tolerance. *Plant Sci*. 180:709-715.
- Gasch, A. P., e Werner-Washburne, M. (2002). The genomics of yeast responses to environmental stress and starvation. *Functional e Integrative Genomics*. 2(4-5):181-192.
- Gibbons, S. M. e Gilbert, J. A. (2015) Microbial diversity – exploration of natural ecosystems and microbiomes. *Curr. Opin. Genet. Dev*. 35:66-72.
- Giorello, F., Valera, M. J., Martin, V., Parada, A. et al., (2019) Genomic and transcriptomic basis of *Hanseniaspora vineae*'s impact on flavor diversity and wine quality. *Appl Environ Microbiol*. 85:e01959-18.
- Glick, B. R. (2012) Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*.
- Gray, E. J., e Smith, D. L. (2005). Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry*. 37(3):395-412.
- Goedert, W. J. (1983) Management of the Cerrado soils of Brazil: a review. *J Soil Sci*. 34:405-28.

- Goudaa, S., Kerryb, R. G., Dasc, G., Paramithiotisd, S., Shine, H. S., Patrac, J. K. (2018) Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiological Research*. 206:131-140.
- Golan, J. J., Pringle, A. (2017). Long-distance dispersal of fungi. *Microbiol Spectrum* 5(4):FUNK-0047-2016.
- Goldemberg, J. et al., (2007) Ethanol for a Sustainable Energy Future. *Science*. 315:808-810.
- Gupta, N., Sabat, J., Parida, R., Kerkatta, D. (2007) Solubilization of tricalcium phosphate and rock phosphate by microbes isolated from chromite, iron and manganese mines. *Acta Bot Croat*. 66:197-204.
- Gupta, N., Gaurav, S.S., Kumar, A. (2013) Molecular Basis of Aluminium Toxicity in Plants: A Review. *American Journal of Plant Sciences*. 4:21-37.
- Gunasekaran, M. (1977) Physiological studies on *Phymatotrichum omnivorum*. IX. Synthesis of indole acetic acid in vitro, *Microbios*. 22:85-91.
- Gadanhó, M., Libkind, D., e Sampaio, J. P. (2006). Yeast Diversity in the Extreme Acidic Environments of the Iberian Pyrite Belt. *Microbial Ecology*, 52(3), 552-563.
- Glickmann, E. and Dessaux, Y. (1995) A Critical Examination of the Specificity of the Salkowski Reagent for Indolic Compounds Produced by Phytopathogenic Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 793-796.
- Gruen, H. E. (1959) Auxins and fungi. *Annu. Rev. Plant Physiol*. 10: 405-440.
- Grum-Grzhimaylo, A. A., Georgieva, M. L., Bondarenko, S. A., Debets, A. J. M., Bilanenko, E. N. (2016) On the diversity of fungi from soda soils. *Fungal Divers* 76:27-74.
- Ghannoum, M.A.; Spellberg, B.; Saporito-Irwin, S.M.; Fonzi, W.A. (1995) Reduced virulence of *Candida albicans* phr1 mutants. *Infect. Immun*. 63: 4528-4530.
- Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., Berg, G., Pirttilä, A. M., et al., (2015). The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 79(3):293-320.

- Hayat, R, Ali, S., Amara, U., Khalid, R., Ahmed, I. (2010) Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Ann Microbiol.* 60:579-598.
- Halder, A. K., Mishra, A. K., Bhattacharyya, P., Chakrabarty, P. K. (1990) Solubilization of rock phosphate by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. *Journal Genetics Applied Microbiology.* 36:81-92.
- Hariprasad, P., Niranjana, S. R. (2009) Isolation and characterization of phosphate solubilizing rhizobacteria to improve plant health of tomato. *Plant and Soil, The Hague.* 316:3-24.
- Hughes, K. W.; Petersen, R. H.; Lickey, E. B. Using heterozygosity to estimate a percentage DNA sequence similarity for environmental species' delimitation across basidiomycete fungi. *New Phytologist.* v. 182, n.4, p. 795-798. 2009.
- Hart, M. M., Trevors, J. T. (2005) Microbe management: application of mycorrhizal in sustainable agriculture. *Front Ecolog Environ.* 3:533-9.
- Haney, C. H. eAusubel, F. M. (2015). Plant microbiome blueprints. *Science.* 349(6250):788-789.
- Hassani, M. A., Durán, P., eHacquard, S. (2018). Microbial interactions within the plant holobiont. *Microbiome.* 6(1).
- Hawksworth DL, Lücking R. (2017) Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. *Microbiol Spectrum,* 5(4):1-17.
- Hermes, C. e Santos, O.S. (2000) Funções, disponibilidade, formas de absorção e fontes de micronutrientes. Universidade Federal de Santa Maria: (UFSM) (Curso de Pós-Graduação em Agronomia) - Rio Grande do Sul.
- Hirsch, A.M. and Fang, Y. (1994) Plant hormones and nodulation: what's the connection? *Plant Mol. Biol.* 26:5-9
- Huang, C. F., Yamaji, N., Mitani, N., Yano, M., Nagamura, Y., and Ma, J. F. (2009). A bacterial-type ABC transporter is involved in aluminum tolerance in rice. *Plant Cell.* 21:655-667.
- Hussain, A., Zahir, Z. A., Asghar, H. N., Ahmad, M. et al., (2018) Zinc Solubilizing Bacteria for Zinc Biofortification in Cereals: A Step Toward Sustainable Nutritional Security - Chapter 7. Springer Nature Singapore Pte Ltd. 2018 203 V. S. Meena (ed.), Role of Rhizospheric Microbes in Soil. 203-227.

- Hirose, N., Nishimura, K., Inoue-Sakamoto, M., e Masuda, M. (2013). Ribosomal Internal Transcribed Spacer of *Prototheca wickerhamii* Has Characteristic Structure Useful for Identification and Genotyping. PLoS ONE, 8(11):e81223.
- Hesham, A.-L., Mohamed, H., (2011) Molecular genetic identification of yeast strains isolated from Egyptian soils for solubilization of inorganic phosphates and growth promotion of corn plants. J. Microbiol. Biotechnol. 21, 55-61.
- Hibbett, D. S. (1992) Ribosomal RNA and fungal systematics. Transactions of mycological Society of Japan. 33:533-556.
- Horikoshi, K. (2016). Alkaliphiles. Extremophiles, 53-78.
- Henry, T., P. C. I en, and S. H. Hinrichs. (2000) Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. J. Clin. Microbiol.38:1510–1515
- Hoffland, E., Findenegg, G. R., Nelemans, J. A. (1989) Utilization of rock phosphate by rape. Plant Soil, 113:155-160.
- Hinsinger, P. (2001) Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. Plant Soil 237:173-195.
- Iqbal, U., Jamil, N., Ali, I., eHasnain, S. (2010). Effect of zinc-phosphate-solubilizing bacterial isolates on growth of *Vigna radiata*. Annals of Microbiology. 60(2):243-248.
- Izzo AD, Agbowo J, Bruns TD. (2005) Detection of plot-level changes in ectomycorrhizal communities in an old-growth mixed conifer forest. New Phytologist 166: 619–630.
- Imran, M., M. Arshad, A. Khalid, S. Kanwal and D.E. Crowley. (2014) Perspectives of rhizosphere microflora for improving Zn bioavailability and acquisition by higher plants. Int. J. Agri. Biol. 16: 53-662.
- Jia, M., Chen, L., Xin, K. L., Zheng, C. J., Rahman, K. Han, T. and Qin, L. P. (2016) A Friendly Relationship between Endophytic Fungi and Medicinal Plants: A Systematic Review. Frontiers in Microbiology. 7(906):1-14.
- Jones, D.L. (1998) Organic acids in the rhizosphere - a critical review. Plant and Soil. 205:25-44.

- Javor, B. (Springer, Berlin, 1989). Hypersaline Environments.
- Junior, R. L. C. B., Landell, M. G. A., Silva, D. N. et al. (2019) Censo varietal IAC de cana-de-açúcar no Brasil - Safra 2017/18 e na região Centro Sul - Safra 2018/19. Campinas: Instituto Agronômico, 2019. 64p. online (Série Tecnologia APTA. Boletim técnico IAC, 221).
- Jones, B. E., Grant, W. D., Duckworth, A. W. e Owenson, G. G. (1998) Microbial diversity of soda lakes. *Extremophiles* 2:191-200
- Jansen, S., Broadley, M.R., Robbrecht, E., Smets, E. (2002) Aluminum hyperaccumulation in angiosperms: a review of if phylogenetic significance. *Bot Rev*, 68:235-269.
- Kawai. F., Zhang, D., Sugimoto, M. (2000) Isolation and characterization of acid- and Al-tolerant microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*. 189:143-147.
- Khan, M. S., Zaidi, A., Ahemad, M., Oves, M. and Wani, P. A.(2012) Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi – current perspective. *Archives of Agronomy and Soil Science*. 56(1):73-98.
- Khan, M. S., Ahmad, E., Zaidi, A., Oves, M. (2013) Functional aspect of phosphate-solubilizing bacteria: importance in crop production. In: Maheshwari DK et al (eds) *Bacteria in agrobiolgy: crop productivity*. Springer, Berlin. 237-265.
- Khan, M.S., Zaidi, A., Ahemad, M., Oves, M., Wani, P.A. (2010) Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi – current perspective. *Archives of Agronomy and Soil Science*. 56(1):73-98.
- Karlen, D. L., Mausbach, M. J., Doran, J. W., Cline, R. G., Harris, R. F., Schuman, G. E. (1997) Soil quality: A concept, definition, and framework for evaluation. *Soil Sci Soc Am J*.61:4-10.
- Kew – Royal Botanic Gardens Kew – Londres. (2019) Disponível em: <https://www.kew.org/science/collections-and-resources/data-and-digital/fungi> e <https://stateoftheworldsfungi.org/> Acessado em: 26 de outubro de 2019.
- Kim, Y.-S., Park, W., Nian, H., Sasaki, T., et al., (2010). Aluminum tolerance associated with enhancement of plasma membrane H⁺-ATPase in the root apex of soybean. *Soil Science and Plant Nutrition*. 56(1):140-149.

- Kirk, P., Cannon, P. F., Minter, D. W. eStalpers, J. A. (2008) 10^a ed. Dictionary of Fungi. CABI Publishing, Wallingford. 771p.
- Kiekens, L (1995) Zinc, in Alloway, B.J. (ed.) Heavy Metals in Soils (2nd edn.). Blackie Academic and Professional, London, pp 284-305.
- Kochian, L. V., Hoekenga, O. A., and Piñeros, M. A. (2004) How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency Annu. Rev. Plant Biol. 55:459-93.
- Kochian, L.V. Piñeros, M. A., Liu, J., Magalhães, J. V. (2017) Plant adaptation to acid soils: the molecular basis for crop aluminum resistance. Annual Review of Plant Biology, Palo Alto. 66:571-598.
- Kloepper, J. W., Tuzun, S., Kuc, J. A. (1992) Proposed definitions related to induced disease resistance. Biocontrol Science and Technology. 2:349-351.
- Krause, K., Henke, C., Asiimwe, T., Ulbricht, A., Klemmer, S. et al., (2015) Indole-3-acetic 1 acid biosynthesis, secretion, and its morphological effects on *Tricholomavaccinum-spruce* ectomycorrhiza. Appl. Environ. Microbiol. 81(20):7003-7011.
- Kumar, J., Singh, D., Ghosh, P., and Kumar, A. (2017) Endophytic and Epiphytic Modes of Microbial Interactions and Benefits. D.P. Singh et al., (eds.), Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological pp 227-253.
- Kroll, S., Agler, M. T. and Kemen, R. (2017) Genomic dissection of host–microbe and microbe–microbe interactions for advanced plant breeding. Current Opinion in Plant Biology. 36:71-78.
- Kumar, A. and Verma, J. P. (2019) The Role of Microbes to Improve Crop Productivity and Soil Health. V. Achal and A. Mukherjee (eds.), Ecological Wisdom Inspired Restoration. 249-265.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution 35:1547-1549.
- Kulkarni, G. B., Sanjeevkumar, S., Kirankumar, B., Santoshkumar, M. and Karegoudar, T. B. (2013) Indole-3-acetic acid biosynthesis in *Fusarium*

delphinoides strain GPK, a causal agent of wilt in chickpea. Appl. Biochem. Biotechnol. 169:1292-1305.

Klugh, K. R., Cumming, J. R. (2007). Variations in organic acid exudation and aluminum resistance among arbuscular mycorrhizal species colonizing *Liriodendron tulipifera*. Tree Physiology. 27(8):1103-1112.

Kurtzman, C. P., C. J. Robnett. (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. Antonie van Leeuwenhoek, 73: 331-371.

Kinraide, T. B. (1993) Aluminum enhancement of plant-growth in acid rooting media - a case of reciprocal alleviation of toxicity by 2 toxic cations. Physiol.Plant 88: 619-625.

Kinraide, T. B., Yermiyahu, U., Rytwo, G. (1998) Computation of surface electrical potentials of plant cell membranes: correspondence to published zeta potentials from diverse plant sources. Plant Physiol., 118: 505-512.

Kurtzman, C. P. Robnett C. J. (1997) Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5'end of the large subunit (26S) ribosomal DNA gene. J. Clin. Microbiol.35, 1216-1223.

Kurtzman, C. P. (2014) Use of gene sequence analyses and genome comparisons for yeast systematics. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. v. 64, p. 325-332.

Kurtzman, C.P., C.J. Robnett and E. Basehoar-Powers. (2008) Phylogenetic relationships among species of *Pichia*, *Issatchenkia* and *Williopsis* determined from multigene phylogenetic analysis, and the proposal of *Barnettozyma gen. nov.*, *Lindnera gen. nov.* and *Wickerhamomyces gen. nov.* FEMS Yeast Res. 8: 939-954

Kurtzman, C. P. *Meyerozyma* Kurtzman and M. Suzuki (2010). In: KURTZMAN, C. P.;FELL, J. W., *et al* (Ed.). The Yeasts: a Taxonomic Study. 5: Elsevier, v.2, 2011. p.621-624.

Kurtzman, C. P., e Fell, J. W. (n.d.). Yeast Systematics and Phylogeny — Implications of Molecular Identification Methods for Kurtzman C.P., Fell J.W. (2006) Yeast Systematics and Phylogeny — Implications of Molecular

Identification Methods for Studies in Ecology. In: Péter G., Rosa C. (eds) Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. The Yeast Handbook. Springer, Berlin, Heidelberg

- Klaubauf, S., Inselsbacher, E., Zechmeister-Boltenstern, S., Wanek, W. et al. (2010) Molecular diversity of fungal communities in agricultural soils from Lower Austria. *Fungal Divers.* 44:65-75.
- Kevbrin, V. V. (2019). Isolation and Cultivation of Alkaliphiles. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. Extremophiles handbook.*
- Krulwich, T. A., Ito, M., Hicks, D. B., Gilmour, R. e Guffanti, A. A. (1998) pH homeostasis and ATP synthesis: studies of two processes that necessitate inward proton translocation in extremely alkaliphilic *Bacillus* species. *Extremophiles* 2, 217-222.
- Kemmitt, S. J., D. Wright, K. W. T. Goulding, and D. L. Jones. (2006) pH regulation of carbon and nitrogen dynamics in two agricultural soils. *Soil Biol. Biochem.* 38:898-911.
- Kawai, F., Zhang, D., Sugimoto, M. (2000) Isolation and characterization of acid- and Al-tolerant microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 189:143-147.
- Kanazawa, S., Chau, N. T. T., Miyaki, S. (2005) Identification and characterization of high acid tolerant and aluminum resistant yeasts isolated from tea soils. *Soil Science and Plant Nutrition*, 1:671-674.
- Kane, P. M. (2016). Proton Transport and pH Control in Fungi. *Yeast Membrane Transport*, 33-68.
- Kochian, L. V. M., Pineros, A. and Hoekenga, O. A. (2005) The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. *Plant and Soil*, 274(1-2):175-195.
- Lai, X., Cao, L., Tan, H., Fang, S., Huang, Y. e Zhou, S. (2007) Fungal communities from methane hydrate-bearing deepsea marine sediments in South China Sea. *ISME J.* 1(8):756-62.
- Lambrecht, M., Okon, Y., VandeBroek, A., and Vanderleyden, J. (2000) Indole-3-acetic acid: A reciprocal signaling molecule in bacteria-plant interactions. *Trends Microbiol.* 8:298-300.

- Lachance, M. A. Yeast Biodiversity: How Many and How Much? In: Péter, G.; Rosa, C. (Org.). Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts, Berlin Heidelberg:Springer, 2006. p.1-9.
- Larson, W. E. and Pierce, F. J. (1994) The dynamics of soil quality as a measure of sustainable management. Pages 37-51 in J.W. Doran, D. C. Coleman, D. F. Bezedick, and B. A. Stewart, eds. Defining soil quality for a sustainable environment. Soil Sci Soc. Am. Special Pub. No. 35, Am. Soc. Agron., Madison, Wise. U.S.A.
- Larran, S., Mónaco, C., eAlippi, H. E. (2001). World Journal of Microbiology and Biotechnology. 17(2):181-184.
- La Rovere, E. L., Pereira, A. S., Simões, A. F. (2011) Biofuels and sustainable energy development in Brazil. Word Development. 39(6):1026-1036.
- Leggett, M., Newlands, N. K., Greenshields, D., West, L., Inman, S., and Koivunen, M. E. (2015). Maize yield response to a phosphorus-solubilizing microbial inoculant in field trials. J. Agric. Sci. 153:1464-1478.
- Li, X. F., Ma, J. F., Matsumoto, H. (2000) Pattern of aluminum-induced secretion of organic acids differs between rye and wheat. Plant Physiology, Rockville. 123(4):1537-1544.
- Liddell, C. M. (1997) Abiotic factors and soilborne diseases. In: Hillocks, R.J. e Waller, J.M. (Eds.) Soilborne Diseases of Tropical Crops. Wallingford. CAB International. 1997. pp.365-376.
- Limtong, S., Koowadjanakul, N. (2012) Yeasts from phylloplane and their capability to produce indole-3-acetic acid. World J Microbiol Biotechnol. 28:3323-3335.
- 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. 30:1785-1796.
- Limtong, S., Chamnanpa, T., Srisuk, N. and Limtong, P. (2015) Diversity of yeasts in vetiver phylloplane in Thailand and their capability to produce indole-3-acetic acid, a plant growth promoter. Ann Microbiol. 65:667–675

- Liu, Y-Y., Chen, H-W., Chou, J-Y. (2016) Variation in Indole-3-Acetic Acid Production by Wild *Saccharomyces cerevisiae* and *S. paradoxus* Strains from Diverse Ecological Sources and Its Effect on Growth. PLoS ONE 11(8):1-13.
- Lleixà, J., Martín, V., Portillo, M. del C., Carrau, F., Beltran, G., e Mas, A. (2016). Comparison of Fermentation and Wines Produced by Inoculation of *Hanseniaspora vineae* and *Saccharomyces cerevisiae*. Frontiers in Microbiology. 7.
- Lopes, A. S., Silva, M. C., Guilherme, L. R. G. (1991) bBletim técnico nº 1 acidez do solo e calagem – ANDA Associação Nacional para Difusão de Adubos São Paulo/ SP 22 p.
- Linton, C. J., Borman, G. C., Holmes, A. D., Szekely, A. et al. (2007) Molecular Identification of Unusual Pathogenic Yeast Isolates by Large Ribosomal Subunit Gene Sequencing: 2 Years of Experience at the United Kingdom Mycology Reference Laboratory. Journal of Clinical Microbiology, 45(4): 1152-1158.
- Lundberg, D.S., Lebeis, S.L., Paredes, S.H., Yourstone, S. et al., (2012) Defining the core Arabidopsis thaliana root microbiome. Nature. 488(7409):86-90.
- Lundberg, D. S., Yourstone, S., Mieczkowski, P., Jones, C. D., and Dangl, J. L. (2013) Practical innovations for high-throughput amplicon sequencing. Nat. Methods 10:999-1002.
- Lugtenberg, B. and Kamilova, F. (2009) Plant-growth-promoting rhizobacteria. Annu. Rev. Microbiol. 63:541-556.
- Lima, G., De Curtis, F., Castoria, R., De Cicco, V. (1998) Activity of the yeasts *Cryptococcus laurentii* and *Rhodotorula glutinis* against postharvest rots on different fruits. Biocontrol Science and Technology, Oxford, 8: 257-267.
- Lisichkina, G. A., Bab'eva, I. P., Sorokin, D. Y. (1993) Alkalitolerant yeasts from natural biotopes. Microbiology, 72:618-620.
- Lu, W., Wen, J., Chen, Y., Sun, B., Jia, X., Liu, M., and Caiyin, Q. (2007) Synergistic effect of *Candida maltosa* HY-35 and *Enterobacter aerogenes* W-23 on hydrogen production, Int. J. Hydrogen Energy, 32:1059-1066.

- Liu, Y., Tang, H., Lin, Z., e Xu, P. (2015). Mechanisms of acid tolerance in bacteria and prospects in biotechnology and bioremediation. *Biotechnology Advances*, 33(7):1484-1492.
- Llopis, J., McCaffery, J.M. Miyawaki, A. Farquhar, M. G. Tsien, R. Y. (1998) Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins, *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, 95:6803-6808.
- Lo, H. J., Köhler, J. R., Di-Domenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A., Fink, G. R (1997) Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell. Sep 5*; 90(5):939-49.
- Ma, J. F., Hiradate, S., Nomoto, K., Iwashita, T., Matsumoto, H. (1997) Internal detoxification mechanism of Al in hydrangea: identification of Al form in the leaves. *Plant Physiol*, 113:1033-1039.
- Ma, J. F., Ryan, P. R., Delhaize, E. (2001) Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends Plant Sci*, 6:273-278.
- Ma, J. F., Ryan, P. R., Delhaize, E. (2001) Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends Plant Sci*.6:273-78.
- Ma, J. F., Shen, R., Zhao, Z., Wissuwa, M., Takeuchi. Y., et al., (2002). Response of rice to Al stress and identification of quantitative trait loci for Al tolerance. *Plant Cell Physiol*. 43:652-59.
- Ma, J. F. (2007) Syndrome of aluminum toxicity and diversity of aluminum resistance in higher plants. *Int Rev Cytol*.264:25-252.
- Ma, J. F., Nagao, S., Sato, K., Ito, H., Furukawa, J., Takeda, K. (2004) Molecular mapping of a gene responsible for Al-activated secretion of citrate in barley. *Journal of Experimental Botany. Oxford*. 55(401):1335-1341.
- Maron, L. G., Piñeros, M. A., Guimarães, C. T., Magalhães, J. V. et al., (2010) Two functionally distinct members of the MATE (multi-drug and toxic compound extrusion) family of transporters potentially underlie two major aluminum tolerance QTLs in maize. *The PlantJournal, Oxford*. 61(5):728-740.
- Machado, F. B. P. (2019) Brasil, a doce terra - História do Setor. Disponível em <https://www.udop.com.br/index.php?item=noticiasecod=26351> Acessado em 24 de agosto de 2019.

- Magalhães, J. V., Piñeros, M. A., Maciel, L. S. and Kochian, L. V. (2018) Emerging Pleiotropic Mechanisms Underlying Aluminum Resistance and Phosphorus Acquisition on Acidic Soils. *Front. Plant Sci.* 9:1420.
- Magalhães, J. V., Liu, J., Guimarães, C. T., Lana, U. G. P., Alves, V. M. C., Wang, Y-H., et al., (2007). A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. *Nat. Genet.* 39:1156–1161.
- Mano, Y., Nemoto, K. (2012) The pathway of auxin biosynthesis in plants. *J Exp Bot.* 63:2853-72.
- Mangunwardoyo, W. eOetari, A. eSjamsuridzal, W. (2011). Screening Cellulose Activity of Yeast Isolated from Soil, Sediment and Water River from Taman Nasional GunungHalimun, West Java, Indonesia. *MalaysianJournalofMicrobiology*.
- Marra, L. M. (2012) Solubilização de fosfatos por bactérias e sua contribuição no crescimento de leguminosas e gramíneas. Tese (Obtenção do título de Doutor em Ciência do Solo). Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais/MG.
- Marquez, L. M., Redman, R. S., Rodriguez, R. J., Roossinck, M. J. (2006) A virus in a fungus in a plant: Three-waysymbiosisrequired for thermaltolerance. *Science.* 315:513-5.
- Marschner, H., Romheld, V., Horst, W. J. and Martin, P. (1986) Root-induced changes of nutrient availability in the rhizosphere. *Journal of Plant Nutrition.* 10(9):1175-1184.
- Masson, J-D., Crépeaux, G., Authier, F-J., Exley, C., eGherardi, R. K. (2018). Critical analysis of reference studies on the toxicokinetics of aluminum-based adjuvants. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 181:87-95.
- Matsumoto, H. (2000) Cell Biology of Aluminum Toxicity and Tolerance in Higher Plants. *International Review of Cytology.* 200:1-47.
- McCall, K. A., C. Huang and A. F. Carol. (2000) Function and mechanisms of zinc metalloenzymes. *J. Plant Nut.* 130:1437-1446.
- McSteen, P. (2010) Auxin and monocot development. *Cold Spring HarbPerspect Biol.* 2:1-27.

- McBride, M., Sauve, S., e Hendershot, W. (1997). Solubility control of Cu, Zn, Cd and Pb in contaminated soils. *European Journal of Soil Science*. 48(2):337-346.
- Mendes, R., Garbeva, P. e Raaijmakers, J. M. (2013) The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiol Rev*. 37:634-663.
- Medina, K., Boido, E., Fariña, L., Gioia, O., Gomez, M. E. et al., (2013). Increased flavour diversity of Chardonnay wines by spontaneous fermentation and co-fermentation with *Hanseniaspora vineae*. *Food Chem*. 141:2513-521.
- Medina, A., Vassileva, M., Caravaca, F., Roldán, A., eAzcón, 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*. *Chemosphere*. 56(5):449-456.
- Michereff, S., Andrade, D. and Menezes, M. (2005) Microbiota dos solos tropicais (eds). Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) – Imprensa Universitária 398 p.
- Mueller, U. G., e Sachs, J. L. (2015). Engineering Microbiomes to Improve Plant and Animal Health. *Trends in Microbiology*. 23(10):606-617.
- Mukherjee, S. and Sen, S. K. (2015) Exploration of novel rhizospheric yeast isolate as fertilizing soil inoculant for improvement of maize cultivation. *J Sci Food Agric*. 95:1491-1499.
- Muller, D. B., Vogel, C., Bai, Y., and Vorholt, J. A. (2016). The plant microbiota: systems-level insights and perspectives. In: *Annual Review of Genetics*. Vol. 50, ed. N. M. Bonini (Palo Alto, CA: Annual Reviews), 211-234.
- Mueller, U. G., e Sachs, J. L. (2015). Engineering Microbiomes to Improve Plant and Animal Health. *Trends in Microbiology*. 23(10):606-617.
- Murphy, B. R., Fiona, I. D., Doohan, M. and Hodkinson, T. R. (2018) From Concept to Commerce: Developing a Successful Fungal Endophyte Inoculant for Agricultural Crops. *J. Fungi*. 11:4(1)
- Mundra, S., Arora, R., Stobdan, T. (2011) Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel temperature-, pH-, and salt-tolerant yeast, *Rhodotorula*

- sp.* PS4, isolated from seabuckthorn rhizosphere, growing in cold desert of Ladakh, India. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 27:2387-2396.
- Mahadevam, A. (1984) Growth Regulators, Microorganisms and Diseased Plants. Oxford e IBH publishing Co., New Dehli.
- Marin, F., Nassif, Daniel. S. P. (2013) Mudanças climáticas e a cana-de-açúcar no Brasil: Fisiologia, conjuntura e cenário futuro. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, 17(2):232-239.
- Morris, H. M., Smith, M. E., Rizzo, D.M., Rejmanek, M., Bledsoe, C.S. (2008) Contrasting ectomycorrhizal fungal communities on the roots of co-occurring oaks (*Quercus* spp.) in a California woodland. New Phytologist 178: 167–176.
- Menezes, J.P.; Lapuatini, M.; Antonioli, Z.I.; Blume, E.; Junges, E.; Manzoni, C.G. Variabilidade genética na região ITS do rDNA de isolados de *Trichoderma* spp.(Biocontrolador) e *Fusarium oxysporum* f.sp. *Chrysanthemi*. Ciência e Agrotecnologia, v. 34, p. 132-139, 2010
- Morais, L., Cursi, D., Santos, J., Carneiro, M., et al. (2015). Melhoramento Genético da Cana-de-Açúcar. Disponível em: <https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br> Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2015. 38 p. (Documentos / Embrapa Tabuleiros Costeiros, ISSN 1678-1953; 200).
- Martins, D., Costa, N. V., Cardoso, L. A., Rodrigues, A. C. P., Silva, J. I. C. (2010) Seletividade de herbicidas em variedades de cana-de-açúcar. Planta Daninha, 28: 1125-1134.
- MacDiarmid, C. W., Gardner, R. C. (1996) Al toxicity in yeast. A role for Mg^{+2} . Plant Physiol, 112:1101-1109.
- Matthews, T.M., Webb, C., Culture systems, in: M.F. Tuite, S.G. Oliver (Eds.), *Saccharomyces* (Biotechnology Handbooks), Plenum Press, New York, 1991, pp. 249–282.
- Manteau, S., Abouna, S., Lambert, B. and Legendre, L. (2003) Differential regulation by ambient pH of putative virulence factors secretion by the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. FEMS Microbiol. Ecol., 43:359-366.

- Martinez-Munoz, G. A., Kane, P. (2008) Vacuolar and plasma membrane proton pumps collaborate to achieve cytosolic pH homeostasis in yeast, *J. Biol. Chem.*, 283:20309-20319.
- MacDiarmid, C.W. e Gardner, R.C. (1996). Al toxicity in yeast - A role for Mg^{2+} . *Plant Physiol.*, 112:1101-1109.
- Nei, M. e Kumar, S. (2000) *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Nally, M.C., Pesce, V.M., Maturano, Y.P., Toro, M.E., et al., (2013) Biocontrol of fungi isolated from sour rot infected table grapes by *Saccharomyces* and other yeast species. *Postharvest Biology and Technology* 86:456-462.
- Nally, M. C., Pesce, V. M., Maturano, Y. P., Rodriguez Assaf, L. A., Toro, M. E., Castellanos de Figueroa, L. I., e Vazquez, F. (2015). Antifungal modes of action of *Saccharomyces* and other biocontrol yeasts against fungi isolated from sour and grey rots. *International Journal of Food Microbiology*. 204:91-100.
- Naraian, R., e Kumari, S. (2017). Microbial Production of Organic Acids. *Microbial Functional Foods and Nutraceuticals*. 93-121.
- Nahas, E. (2002) Microrganismos do solo produtores de fosfatases em diferentes sistemas agrícolas. *Bragantia*, Campinas. 61(3):267-275.
- Nassar, A. H., El-tarabily, K. A., Sivasithamparam, K. (2005) Promotion of plant growth by an auxin-producing isolate of the yeast *Williopsis saturnus* endophytic in maize (*Zea mays* L.) roots. *Biology and Fertility of Soils*, Berlin. 42:97-108.
- Nassar, A. M., Rudorff, B. F. T., Antoniazzi, L. B., Aguiar, D. A. et al., (2008) Prospects of the sugarcane expansion in Brazil: impacts on direct and indirect land use changes. In: *Sugarcane ethanol – Contributions to climate change mitigation and the environment*. The Netherlands: Wageningen Academic Publishers, p. 63-93.
- Nahas, E., Centurion, J.F., Assis, L. C. (1994) Microrganismos solubilizadores de fosfato e produtores de fosfatases de vários solos. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas. 18(1):43-48
- NCBI – Taxonomia da cana-de-açúcar. National Center for Biotechnology (2019) Information. Acessado em: 25 de outubro de 2019.

Disponível

em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=4546>.

- Nelson, E. B. (2017). The seed microbiome: Origins, interactions, and impacts. *Plant and Soil*. 422(1-2):7-34.
- Nakayan, P., Hameed, A., Singh, S., Young, L., Hung, M., Young, C. (2013) Phosphate-solubilizing soil yeast *Meyerozyma guilliermondii* CC1 improves maize (*Zea mays* L.) productivity and minimizes requisite chemical fertilization. *Plant Soil*. 373:301-315.
- Nguyen, V. A. T., Senoo, K., Mishima, T. and Hisamatsu M. (2001) Multiple Tolerance of *Rhodotorula ghitrtis* R-1 to Acid, Aluminum Ion and Manganese Ion, and Its Unusual Ability of Neutralizing Acidic Medium. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 92(4):366-371.
- Nguyen, C., Yan, W., Le Tacon, F., eLapeyrie, F. (1992). Genetic variability of phosphate solubilizing activity by monocaryotic and dicaryotic mycelia of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* (Maire) P.D. Orton. *Plant and Soil*. 143(2):193-199.
- Normanly, J. (2010) Approaching Cellular and Molecular Resolution of Auxin Biosynthesis and Metabolism. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2(1):a001594.
- Nutaratat, P., Srisuk, N., Arunrattiyakorn, P., Limtong, S. (2014) Plant growth-promoting traits of epiphytic and endophytic yeasts isolated from rice and sugar cane leaves in Thailand. *Fungal Biology*. 118:683-694.
- Nilsson, R. H., Anslan, S., Bahram, M., Wurzbacher, C. et al. (2019) Mycobiome diversity: high-throughput sequencing and identification of fungi. *Nature|Microbiology Reviews*. volume 17.
- Nova Cana (2020) Melhoramento genético da cana e biotecnologia. Acessado em: 22 de fevereiro de 2020.
- Disponível em: <https://www.novacana.com/cana/melhoramento-genetico-da-cana-biotecnologia>.
- Nagai, K., Suzuki, K., Okada, G. (1998) Studies on the distribution of alkaliphilic and alkalitolerant soil fungi II: fungal flora in two limestone caves in Japan. *Mycoscience*, 39:29-298.

- Nagai, K., Suzuki, K., Okada, G. (1998) Studies on the distribution of alkaliphilic and alkalitolerant soil fungi II: fungal flora in two limestone caves in Japan. *Mycoscience*, 39:293-298.
- Nei M. and Kumar S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Nadsonia and Saccharomycodes based on the partial sequences of the 18S and 26S ribosomal ribonucleic acids. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 38: 585-596
- Neza Cadez, Peter Raspor, Arthur W.A.M. de Cock, Teun Boekhout, Maudy Th Smith, Molecular identification and genetic diversity within species of the genera *Hanseniaspora* and *Kloeckera*, *FEMS Yeast Research*, Volume 1, Issue 4, January 2002, Pages 279-289
- Nguyen, V. A. T., Senoo, K., Mishima, T., and Hisamatsu, M. (2001) Multiple tolerance of *Rhodotorula glutinis* R-1 to acid, aluminum ion and manganese ion, and its unusual ability of neutralizing acidic medium, *J. Biosci. Bioeng.*, 92:366-371.
- Norvell, W.A. e Lindsay, W.L. (1969) Reaction of EDTA complexes of Fe, Zn, Mn, and Cu with soils. *Soil Science Society of America Proceedings*, Madison, 33:86-91.
- OECD/FAO (2018), *OECD-FAO Agricultural Outlook 2018-2027*, OECD Publishing, Paris/Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome
- Ogut, M., ER, F., Kandemir, N. (2010) Phosphate solubilization potentials of soil *Acinetobacter* strains. *Biology and Fertility Soils*. 46:707-715.
- Obledo, E. N. (2003). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 74(3):237-241.
- Olasupo, N. A., Bakre, S., Teniola, O. D. and James, S. A. (2003) Identification of yeasts isolated from Nigerian sugar cane peels. *J. Basic Microbiol.* 43(6):530–533.
- Oliveira, L. G., Cavalcanti, M. A. Q., Fernandes, M. J. S., e Lima, D. M. M. (2013). Diversity of filamentous fungi isolated from the soil in the semiarid area, Pernambuco, Brazil. *Journal of Arid Environments*. 95:49-54.

- Ovečka, M., eTakáč, T. (2014). Managing heavy metal toxicity stress in plants: Biological and biotechnological tools. *Biotechnology Advances*. 32(1):73-86.
- Ouyang J, Shao X, Li J. (2000) Indole-3-glycerol phosphate, a branchpoint of indole-3-acetic acid biosynthesis from the tryptophan biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 24:327-3.
- Orozco-Mosqueda, M. D. C., Rocha-Granados, M. D. C., Glick, B. R. , Santoyo, G. (2018). Microbiome engineering to improve biocontrol and plant growth-promoting mechanisms. *Microbiological Research*:208:25-31.
- Okada, G., Niimura, Y., Sakata, T., Uchimura, T., Ohara, N., Suzuki, H., Kozaki, M. (1993) *Acremonium alcalophilum*, a new alkalophilic cellulolytic hyphomycete. *Trans Mycol Soc Jpn*, 34:171-185.
- O'Brian HE, Parrent JL, Jackson JA, Moncalvo J-M, Vilgalys R. 2005. Fungal community analysis by large scale sequencing of environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 5544-5550.
- Orij, R., Postmus, J., Ter Beek, A., Brul, S., Smits, G. J. (2009) In vivo measurement of cytosolic and mitochondrial pH using a pH-sensitive GFP derivative in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a relation between intracellular pH and growth, *Microbiology*, 155:268-278.
- Orejas, M., Esmassa, E. A., Tilbum, J., Sarkar, S., et al (1995) Activation of the *Aspergillus* PacC transcription factor in response to alkaline ambient pH requires proteolysis of the carboxy-terminal moiety. *Gene and Development*. 9:1622-1632.
- Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Chevalot, I., Komaitis, M., Marc, I., Aggelis, G. (2006) Influence of glucose and saturated free fatty acid mixtures on citric acid and lipid production by *Yarrowialipolytica*. *Curr. Microbiol*. 52:134-142.
- Palmer, C. M., eGuerinot, M. L. (2009). Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Nature Chemical Biology*. 5(5):333-340.
- Patten, C. L.; Glick, B. R. (1996) Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology*. 42:207-220.
- Rattan, R.K., Shukla, L.M. (1991) Influence of different zinc carriers on the utilization of micronutrients by rice. *J. Indian Soc. Soil Sci*. 39:808-810.

- Peay, K. G., Kennedy, P. G., e Talbot, J. M. (2016). Dimensions of biodiversity in the Earth mycobiome. *Nature Reviews Microbiology*. 14(7):434-447.
- Phaff, H. J., Miller, M. W., Mark, E. M. (1978) *The life of yeasts*, 2nd edn. Harvard University Press, Cambridge.
- Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P., e van der Putten, W. H. (2013). Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*. 11(11):789-799.
- Porras-Alfaro, A., and Bayman, P. (2011) Hidden fungi, emergent properties: Endophytes and microbiomes. *Ann. Rev. Phytopathol.* 49:291-315.
- Prusty, R., Grisafi, P., Fink, G.R. (2004) The plant hormone indoleacetic acid induces invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 101:4153-4157.
- Porter, T. M.; Golding, G. B. (2011) Are similarity- or phylogeny-based methods more appropriate for classifying internal transcribed spacer (ITS) metagenomic amplicons? *New Phytologist*, v. 192, p. 775-782.
- Pineros, M. A. and Kochian, L. V. (2001) A patch-clamp study on the physiology of aluminum toxicity and aluminum tolerance in maize. Identification and characterization of Al³⁺ anion channels. *Plant Physiology*, 125(1):292-305.
- Peñalva, M. A., e Arst, Jr., H. N. (2004). Recent Advances in the Characterization of Ambient pH Regulation of Gene Expression in Filamentous Fungi and Yeasts. *Annual Review of Microbiology*, 58(1):425-451.
- Prusky, D. and Yakoby, N. (2003) Pathogenic fungi: leading or led by ambient pH? *Molecular Plant Pathology*, 4(6):509-516.
- Popolo, L., Degani, G., Camilloni, C., e Fonzi, W. (2017). The PHR Family: The Role of Extracellular Transglycosylases in Shaping *Candida albicans* Cells. *Journal of Fungi*, 3(4), 59.
- Prusky, D., McEvoy, J. L., Saftner, R., Conway, W. S. and Jones, R. (2003) The relationship between host acidification and virulence of *Penicillium* spp. on apple and citrus fruit. *Phytopathology*, 93, in press.
- Portillo, F. (2000) Regulation of plasma membrane H(+)-ATPase in fungi and plants. *Biochim. Biophys. Acta*, 1469:31-42.

- Palmgren, M. G. and Nissen, P. (2011) P-Type ATPases. *Annu. Rev. Biophys.* 40:243-66.
- Rao, R. P., Hunter, A., Kashpur, O., Normanly, J. (2010) Aberrant synthesis of indole-3-acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae* triggers morphogenic transition, a virulence trait of pathogenic fungi. *Genetics*.185:211-20.
- Redman, R. S., Sheehan, K. B., Stout, R. G., Rodriguez, R. J., Henson, J. M. (2002) Thermotolerance Generated by Plant/Fungal Symbiosis. *Science*. 298(5598):1581.
- Reineke, G., Heinze, B., Schirawski, J., Buettner, H. et al., (2008) Indole-3-acetic acid (IAA) biosynthesis in the smut fungus *Ustilago Maydis* and its relevance for increased IAA levels in infected tissue and host tumour formation. *Molecular Plant Pathology*. 9(3):339-355.
- Rengel, Z., Zhang, W. H. (2003) Role of dynamics of intracellular calcium in aluminium toxicity syndrome. *New Phytologist*. 159:295-314.
- Richardson, A. E. and Simpson, R. J. (2011) Soil Microorganisms Mediating Phosphorus Availability. *Plant Physiology*. 156:989-996.
- Richardson, A. E. (2001) Prospects for using soli microorganisms to improve the acquisition of phosphous by plants. *Australian Journal of Plant Physiology*, Victoria. 28:897-906.
- Richardson, A. E. (2019) Acessado em: 27 de outubro de 2019. Disponível em: http://webcd.usal.es/web/psm/abstracts/Richardson2.htm_
- Robinson, M. Riov, J. and Sharon, A. (1998) Indole-3-Acetic AcidBiosynthesis in *Colletotrichumgloeosporioides* sp. *aeschynomene*. *Applied and Environmental Microbiology*. 5030-5032.
- Robinson, T. W., Stier, T. J. B. (1941) Formation of auxin in yeast cultures. *J Gen Physiol*. 24(6):765-769.
- Rodriguez, H., Fraga, R., (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol. Adv*. 17:319-339.
- Rodriguez, R. J., Henson, J., Van Volkenburgh, L., Hoy, M., Wright, L., Beckwith, F., et al., (2008) Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. *The ISME Journal*. 2:404-416.

- Rokhbakhsh-Zamin, F., Sachdev, D., Kazemi-Pour, N., Engineer, A. et al., (2011) Characterization of Plant-Growth-Promoting Traits of *Acinetobacter* Species Isolated from Rhizosphere of *Pennisetum glaucum*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 21(6):556-566.
- Rouphael, Y., Cardarelli, M., Collac, G. (2015) Role of arbuscular mycorrhizal fungi in alleviating the adverse effect of acidity and aluminium toxicity in zucchini squash. *Scientia Horticulturae*. 188:97-105.
- Riaz, M., Yan, L., Wu, X., Hussain, S., Aziz, O., Jiang, Q. (2018) Mechanisms of organic acids and boron induced tolerance of aluminum toxicity: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 165:25-35.
- Ryan, P. R., Raman, H., Gupta, S., Horst, W. J., and Delhaize, E. (2009). A second mechanism for aluminum resistance in wheat relies on the constitutive efflux of citrate from roots. *Plant Physiol.* 149:340-351.
- Ryan, P. R., Delhaize, E., Jones, D. L. (2001) Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 52:527-560.
- Raymond Eder, M. L., Conti, F., e Rosa, A. L. (2018). Differences Between Indigenous Yeast Populations in Spontaneously Fermenting Musts From *V. vinifera* L. and *V. labrusca* L. Grapes Harvested in the Same Geographic Location. *Frontiers in Microbiology*. 9:1320.
- Rudgers, J. A., Koslow, J. M., Clay, K. (2004) Endophytic fungi alter relationships between diversity and ecosystem properties. *Ecol Lett.* 7:42-51.
- Ruanpanun, P., Tangchitsomkid, N., Hyde, K. D., Lumyong, S. (2010) Actinomycetes and fungi isolated from plant-parasitic nematode infested soils: screening of the effective biocontrol potential, indole-3-acetic acid and siderophore production. *World J Microbiol Biotechnol.* 26:1569-1578.
- Reed, G. and T. W. Nagodawithana. (1991) *Yeast Technology*, Ed. van Nostrand
- Ramos, T. C. D. A. (2016) Identificação e caracterização genética para prospecção do potencial biotecnológico de fungos filamentosos isolados de solos do quadrilátero ferrífero – MG. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias pela Universidade Federal de São João

Del Rei, Campus Sete Lagoas - MG, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias, na área de concentração em Produção Vegetal.

- Rannala, B.; Yang, Z. Probability distribution of molecular evolutionary trees: A new method of phylogenetic inference. *Journal of Molecular Evolution*, v.43, p.304-311, 1996
- Ryberg M, Nilsson RH, Kristiansson E, Topel M, Jacobsson S, Larsson E. 2008. Mining metadata from unidentified ITS sequences in GenBank: a case study in *Inocybe* (Basidiomycota). *BMC Evolutionary Biology* 8: 50-64
- Reinhold, New York.pp. 385-400. 2.
- Roos, A., Boron, W. F. (1981) Intracellular pH, *Physiol. Rev.*, 61:296-434.
- Rothschild, L. J., e Mancinelli, R. L. (2001). Life in extreme environments. *Nature*, 409 (6823):1092-1101.
- Rousk, J., Brookes, P. C., Bååth, E. (2009) Contrasting Soil pH Effects on Fungal and Bacterial Growth Suggest Functional Redundancy in Carbon Mineralization. *Applied and Environmental Microbiology*, 1589-1596.
- Ryan, P. R., Delhaize, E. (2010) The convergent evolution of aluminium resistance in plants exploits a convenient currency. *Funct Plant Biol*, 37:275-284.
- Russo, G., Libkind, D., Sampaio, J. P., and van Broock, M. R. (2008) Yeast diversity in the acidic Rio Agrio-Lake Caviahue volcanic environment (Patagonia, Argentina), *FEMS Microbiol. Ecol.*, 65:415-424.
- Ruijter, G. J. G., van de Vondervoort, P. J. I. and Visser, J. (1999) Oxalic acid production by *Aspergillus niger*: an oxalate-non-producing mutant produces citric acid at pH 5 and in the presence of manganese. *Microbiology*, 145: 2569-2576.
- Rudrappa, T., Czymmek, K. J., Paré, P. W., Bais, H. P. (2008) Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. *Plant Physiol* 148:1547-1556.
- Rollins, J. A. and Dickman, M. B. (2001) pH signaling in *Sclerotinia sclerotiorum*: identification of pacC/RIM1 homolog. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67:75-81.

- Santos, I. B., Lima, D. R. M., Barbosa, J. G., Oliveira, J. T. C. et al., (2012) Bactérias diazotróficas associadas a raízes de cana-de-açúcar: solubilização de fosfato inorgânico e tolerância à salinidade. *Biosci J Uberlândia*. 28:142-149.
- Sapp, J. (2004) The dynamics of symbiosis: an historical overview. *Can J Bot*. 82:1046-1056.
- Sharma, A. Shankhdhar, D. and Shankhdhar, S.C. (2014) Growth promotion of the rice genotypes by pgprs isolated from rice rhizosphere. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 14(2):505-517.
- Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., Gobi, T. A. (2013) Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springerplus*. 2:587.
- Saha, M., Sarkar, S, Sarkar. B., Sharma, B. K., Bhattacharjee, S., Tribedi, P. (2016) Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environ Sci Pollut Res*. 23:3984-3999.
- Sansone, G., Rezza, I., Calvente, V., Benuzzi, D., Tosetti, M. I. S. D. (2005) Control of *Botrytis cinerea* strains resistant to iprodione in apple with rhodotorulic acid and yeasts. *Postharvest Biol. Tech*. 35:245-251.
- Saravanan, V. S., Subramoniam, S. R. and Raj, S. A. (2003) Assessing *in vitro* solubilization potential of different zinc solubilizing bacterial (ZSB) isolates. *Brazilian Journal of Microbiology*. 34:121-125.
- Saravanan, V. S., Madhaiyan, M., Thangaraju, M. (2007) Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Chemosphere*. 66:1794-1798.
- Sarris, D., Galiotou-Panayotou, M., Koutinas, A. A., Komaitis, M. and Papanikolaou, S. (2011) Citric acid, biomass and cellular lipid production by *Yarrowia lipolytica* strains cultivated on olive mill wastewater-based media. *J Chem Technol Biotechnol*. 86:1439-1448.
- Saitou N. and Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.

- Saxena, J., Saini, A., Ravi, I., Chandra, S., e Garg, V. (2015). Consortium of Phosphate-solubilizing Bacteria and Fungi for Promotion of Growth and Yield of Chickpea (*Cicer arietinum*). *Journal of Crop Improvement*. 29(3):353-369.
- Sade, H., Meriga, B., Surapu, V., Gadi, J., Sunita, M. S. L., Suravajhala, P., e Kavi Kishor, P. B. (2016). Toxicity and tolerance of aluminum in plants: tailoring plants to suit to acid soils. *BioMetals*. 29(2):187-210.
- Sasse, J., Martinoia, E., e Northen, T. (2018). Feed Your Friends: Do Plant Exudates Shape the Root Microbiome? *Trends in Plant Science*. 23(1):25-41.
- Schardl, C. L. (2001) *Epichloefestuceae* and related mutualistic symbionts of grasses. *Fungal Gen Biol*. 33:69-82.
- Sanches, P. A. e Salinas, J. G. (1981) Low input management technology for managing Oxisols and Ultisols in Tropical América. *Adv. Agron*. 34:279-406.
- Schäfer, T., e Adams, T. (2014). The Importance of Microbiology in Sustainable Agriculture. *Principles of Plant-Microbe Interactions*. 5-6.
- Schlaeppli, K. and Bulgarelli, D. (2015) The Plant Microbiome at Work. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 28(3):212-217.
- Schubler, A., Schwarzott, D., Walker, C. (2001) A new fungal phylum, the Glomeromycota, phylogeny and evolution. *Mycol Res*. 105:1413-1421.
- Simões, C. C., Melo, J. O., Magalhães, J. V., Guimarães, C. T. (2012) Genetic and molecular mechanisms of aluminum tolerance in plants. *Genet Mol Res*. 11(3):1949-1957.
- Simon, S. and Petrášek, J. (2011) Why plants need more than one type of auxin. *Plant Science*. 180:454-460.
- Santos, P. H. D (2017) Patogenicidade e caracterização morfomolecular de fungos botriosphaeriaceos associados ao coqueiro e filogeografia de *Lasioidiplodia theobromae*. Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes/RJ.
- Smith ME, Douhan GW, Rizzo DM. (2007) Ectomycorrhizal community structure in a xeric *Quercus* woodland based on rDNA sequence analysis of sporocarps and pooled roots. *New Phytologist* 174: 847–863.

- Sampaio, J. P. *Rhodotorula* Harrison (1928). In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W., *et al* (Ed.). *The Yeasts: a Taxonomic Study*. 5: Elsevier, v.3, 2011. p.1873-1928.
- Santos, E. A., DE Oliveira, R. B., Medonça-Hagler, L. C.; Hagler, A. N. Yeast associated with flower and fruits from a semi-arid region of northeastern Brazil. *Review of Microbiology*, v.27, p.33-40, 1996
- Seguel, A., Cumming, J.R., Klugh-Stewart, K., Cornejo, P., Borie, F. (2013) The role of arbuscular mycorrhizas in decreasing aluminium phytotoxicity in acidic soils: a review. *Mycorrhiza*. 23:167-183.
- Silva filho, G. N., Narloch, C. e Scharf, R. (2002) Solubilização de fosfatos naturais por microrganismos isolados de cultivos de *Pinus* e *Eucalyptus* de Santa Catarina. *Pesq. Agropec. Bras.* 37::847-854.
- Silva, M. O. (2011) Bactérias associadas à cana-de-açúcar: isolamento e potencial promoção de crescimento vegetal. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife/PE.
- Silva, J. F. (2010) Isolamento e caracterização de estirpes bacterianas associadas à cana-de-açúcar com características para a promoção de crescimento vegetal. Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.
- da Silva-Filho, E. A., Brito dos Santos, S. K., Resende, A. M., de Morais, J. O., de Morais, M. A. Jr., Ardaillon, S. D. (2005) Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR fingerprinting. *Antonie van Leeuwenhoek*: 88:13-23
- Silva Filho, G. N., Vidor, C. (2001) Atividade de microrganismos solubilizadores de fosfatos na presença de nitrogênio, ferro, cálcio e potássio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 36(12):1495-1508.
- Smith, S. E., Smith, F. A. (2011) Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystems scales. *Annu Rev Plant Biol.* 63:227-250.
- Srinivasan, R., Yandigeri, M. S., Kashyap, S., Alagawadi, A. R. (2012) Effect of salt on survival and P-solubilization potential of phosphate solubilizing

microorganisms from salt affected soils. Saudi Journal of Biological Sciences.19:427-434.

- Singh, S., Tripathi, D. K., Singh, S., Sharma, S., Dubey, N. K., Chauhan, D. K., eVaculík, M. (2017). Toxicity of aluminium on various levels of plant cells and organism: A review. Environmental and Experimental Botany. 137:177-193.
- Silambarasan, S., Logeswari, P., Cornejo, P., Abraham, J., e Valentine, A. (2019). Simultaneous mitigation of aluminum, salinity and drought stress in *Lactuca sativa* growth via formulated plant growth promoting *Rhodotorula mucilaginosa* CAM4. Ecotoxicology and Environmental Safety. 180:63-72.
- Strobel, G. (2006) Harnessing endophytes for industrial microbiology. CurrOpinMicrob. 9:240-244.
- Sharaf, E. F. and Farrag, A. A. (2004) Induced resistance in tomato plants by IAA against *Fusarium oxysporum* lycopersici. Pol. J. Microbiol. 53:111-116.
- Shaikh, S. S., Saraf, M. S. (2017) Optimization of growth conditions For zinc Solubilizing Plant Growth associated Bacteria and Fungi J Adv Res Biotech. 2(1):1-9.
- Spaepen, S. and Vanderleyden, L. (2011) Auxin and Plant-Microbe Interactions. Cold Spring HarbPerspect Biol. 3:1-4.
- Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R. (2007) Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. FEMS Microbiol Rev. 31:425-48.
- Spencer, J. F. T., Spencer, D, M. (1997) Ecology: where yeasts live. In: Spencer JFT, Spencer DM (eds) Yeasts in natural and artificial habitats. Springer, Berlin. 33-57.
- Syed, S., e Prasad Tollamadugu, N. V. K. V. (2019). Role of Plant Growth-Promoting Microorganisms as a Tool for Environmental Sustainability. Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry. 209-222.
- Sayer, J. A., Raggett, S. L. e Gadd, G. M. (1995). Solubilization of insoluble metal compounds by soil fungi: development of a screening method for solubilizing ability and metal tolerance. Mycological Research. 99:987-993.

- Sayer, J. A. and Gadd, G. M. (1997) Solubilization and transformation of insoluble inorganic metal compounds to insoluble metal oxalates by *Aspergillus niger*. *Mycological Research*. 101(6):653-661.
- Sauer, M., Porro, D., Mattanovich, D., eBranduardi, P. (2008). Microbial production of organic acids: expanding the markets. *Trends Biotechnol*. 26(2):100-108.
- Song, O. R., Lee, S. J., Lee, Y. S., Lee, S. C., Kim, K. K., Choi, Y. L. (2008) Solubilization of insoluble inorganic phosphate by *Burkholderiacepacia* DA23 isolated from cultivated soil. *Baraz J Microbiol*, 39:151-156.
- Sridevi, M.; Mallaiah, K. V. (2009) Phosphate solubilization by *Rhizobium* strains. *Indian Journal of Microbiology*. 49:98-102.
- Sun, P. F., Fang, W. T. Shin, L. T., Wei, J. Y., Fu, S. F., Chou, J. Y (2014) Indole-3-Acetic Acid-Producing Yeasts in the Phyllosphere of the Carnivorous Plant *Drosera indica* L. *PLOS ONE*. 2:1-22.
- Strzelczyk, E., Pokojaska, A., Kampert, M, (1992). The effect of pH on production of plant growth regulators by mycorrhizal fungi. *Symbiosis*.14:201-215.
- Seiffert, K. (2009) Progress toward DNA barcoding of fungi. *Molecular Ecology Resources*. 9 (Suppl 1):83-89.
- Scorzetti, G., Fell, J.W., Fonseca, A., Statzell-Tallman, A. (2002) Systematics of basidiomycetous yeasts: A comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. *FEMS Yeast Res* 2:495-517.
- Silva, E. G., M. F., Borges, C., Medina, R. H., Piccoli e R. F. Schwan. (2005) Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. *FEMS Yeast Research*, 5: 859-865.
- Swangkeaw, J., Vichitphan, S., Butzke, C. E. e Vichitphan, K. (2011) Characterization of β -glucosidases from *Hanseniaspora* sp. and *Pichia anomala* with potentially aroma-enhancing capabilities in juice and wine. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27: 423-430.
- Starmer, W. T. e Lachance, M. A. (2011) Yeast Ecology. In: C. P. Kurtzman, J. W. Fell, T. Boekhout. *The Yeasts: A Taxonomic Study*, Volume 1. Elsevier
- Stockinger, H., Krüger, M., Schüßler, A. (2010) DNA barcoding of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* 187:461-474.

- Shen, H., He, L. F., Sasaki, T., Yamamoto, Y., Zheng, S.J. et al. (2005) Citrate secretion coupled with the modulation of soybean root tip under aluminum stress. Up-regulation of transcription, translation, and threonine-oriented phosphorylation of plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiol* 138: 287-296.
- Schleper, C., Pühler, G., Kuhlmoorgen, B. e Zillig, W. (1995) Life at extremely low pH. *Nature*, 375:741-742
- Singh, S., Tripathi, D. K., Singh, S., Sharma, S., Dubey, N. K., Chauhan, D. K., e Vaculík, M. (2017). Toxicity of aluminium on various levels of plant cells and organism: A review. *Environmental and Experimental Botany*, 137:177-193.
- Singh, S., Tripathi, D. K., Singh, S., Sharma, S., Dubey, N. K., Chauhan, D. K., e Vaculík, M. (2017). Toxicity of aluminium on various levels of plant cells and organism: A review. *Environmental and Experimental Botany*, 137, 177-193.
- Serrano, R. (1996) Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *Int. Rev. Cytol.*165:1-52.
- Schott, E.J., and Gardner, R.C. (1997) Aluminum-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genetics*, 254:63-72.
- Seguel, A., Meier, S., Azcón, R., Valentine, A., Meriño-Gergichevich, C., et al. (2019) Showing their mettle: Extraradical mycelia of arbuscular mycorrhizae form a metal filter to improve host Al tolerance and P nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.
- Socicana – Associação dos Fornecedores de Cana de Guariba (2020) Acessado em: 22 de fevereiro de 2020.
- Disponível em: <http://socicana.com.br/2.0/wp-content/uploads/2012-10-31-11-22-CatalogodeVariedadesRB.pdf>
- Disponível em:
<http://socicana.com.br/2.0/wp-content/uploads/Variedades-SP.pdf>
- Scott, A.; Knott, M. (1974) Cluster-analysis method for grouping means in analysis of variance. *Biometrics*, Washington D.C.,30:(3)507-512.
- Schleper, C.; Puehler, G.; Kuhlmoorgen, B.; Zillig, W. (1995) Life at extremely low pH. *Nature*, 375:741-742.

- Sas, L., Rengel, Z., Tang, C. (2001) Excess cation uptake, and extrusion of protons and organic acid anions by *Lupinus albus* under phosphorus deficiency. *Plant Sci* 160:1191-1198.
- Tanghe, A., Prior, B., eThevelein, J. M. (n.d.). (2006).Yeast Responses to Stresses. Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. In: Péter, G., e Rosa, C. (Eds.). (2006). Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. The Yeast Handbook. 175-195.
- Teale, W. D., Paponov, I. A., e Palme, K. (2006). Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews Molecular CellBiology*. 7(11):847-859.
- Tsai, S.M., Baraibar, A.V.L. e Romani, V.L.M. (1992) Efeito de fatores do solo. In: Cardoso, E.J.B.N., Tsai, S.M. e Neves, M.C.P. (Eds.) *Microbiologia do Solo*. Campinas. Sociedade Brasileira do Solo. 1992. pp.59-67.
- Trabelsi, D., eMhamdi, R. (2013). Microbial Inoculants and Their Impact on Soil Microbial Communities: A Review. *BioMed Research International*. 1-11.
- Tromas, A., Perrot-Rechenmann, C. (2010) Recent progress in auxin biology. *C R Biol*. 333:297-306.
- Turner, T. R., Ramakrishnan, K., Walshaw, J., Heavens, D., Alston, M., Swarbreck, D., et al., (2013). Comparative metatranscriptomics reveals kingdom level changes in the rhizosphere microbiome of plants. *ISME J*. 7:248-2258.
- Turner, T. R., James, E. K., e Poole, P. S. (2013). The plant microbiome. *Genome Biology*. 14(6).
- Trindade, R. C., Resende, M. A., Silva, C. M. e Rosa, C. A. (2002) Yeasts associated with fresh and frozen pulps of Brazilian tropical fruits. *Systematic and Applied Microbiology*, 25: 294-300.
- Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipski, A.; Kumar, S. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, v.30, p.2725-2729, 2013

- Thomloudi, E.-E., Tsalgatidou, P.C., Douka, D., et al (2019) Multistrain versus single-strain plant growth promoting microbial inoculants - The compatibility issue. *Hellenic Plant Protection Journal* 12: 61-77.
- Taylor, G.J. (1988) The physiology of aluminum tolerance in higher plants. *Communication in Soil Science and Plant Analysis*, New York, 19:1179-1194.
- Takashima, M., Sugita, T., Toriumi, Y., and Nakase, T. (2009) *Cryptococcus tepidarius* sp. nov., a thermotolerant yeast species isolated from a stream from a hot spring area in Japan, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 59:181-185.
- ÚNICA- União da Indústria de Cana-de-açúcar - Acompanhamento quinzenal da safra na região Centro-Sul. - Posição até 16/02/2019.
- Ulrich, J. M. (1960) Auxin production by mycorrhizal fungi. *Physiol. Plant.* 13:429-443.
- UDOP - União Nacional da Bioenergia (2020) Acessado em: 22 de fevereiro de 2020.
- Disponível em:
- https://www.udop.com.br/download/estatistica/producao_estados/13fev20_acompanhamento_producao_safra_2019a2020_divulgado_31jan20.pdf
- Disponível em: <https://www.udop.com.br/index.php?item=caracteristicas>
- Vassileva, M., Azcon, R., Barea, J-M., Vassilev, N. (2000) Rock phosphate solubilization by free and encapsulated cells of *Yarrowialipolytica*. *Process Biochem.* 35:693-697.
- Vannette, R. L.; Rasmann, S. (2012) Arbuscular mycorrhizal fungi mediate below-ground plant–herbivore interactions: A phylogenetic study. *Funct. Ecol.* 26:1033-1042.
- Velásquez, V. B.; Cárcamo, M.P.; Meriño, C.R.; Iglesias, A.F.; Durán, J.F. (2007) Intraspecific differentiation of Chilean isolates of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* as revealed by RAPD, SSR and ITS markers. *Genetics and Molecular Biology*, v. 30, p. 89-99.
- Vieira, Mariana e D'Silva, Alice e Gil, Viviane e Vaz, Aline e Alves, Tania e Zani, Carlos e Rosa, Carlos e Rosa, Luiz. (2011). Diversity and antimicrobial activities

of the fungal endophyte community associated with the traditional Brazilian medicinal plant *Solanum cernuum* Vell. (Solanaceae). Canadian journal of microbiology. 58. 54-66. 10.1139/w11-105.

Vaughan-Martini, A., Kurtzman, C. P., Meyer, S. A., e O'Neill, E. B. (2005). Two new species in the *Pichia guilliermondii* clade: *Pichia caribbica* sp. nov., the ascosporic state of *Candida fermentati*, and *Candida carpophila* comb. nov. FEMS yeast research, 5(4-5), 463-469

Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S., Boyce, A. N. (2016) Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Sustainability – A Review. Molecules. 21(573):2-17.

Verma, S. C., Ladha, J. K. (2001) Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. Journal of Biotechnology. 91:127-141.

Vessey, J.K. (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant Soil 255:571-586.

Viana, F., Belloch, C., Vallés, S., and Manzanares, P. (2011). Monitoring a mixed starter of *Hanseniaspora vineae*-*Saccharomyces cerevisiae* in natural must: impact on 2-phenylethyl acetate production. Int. J. Food Microbiol. 151:235-240.

Vieira, M. L. A., Hughes, A. F. S., Gil V. B., Vaz, A. B. M., et al., (2012) Diversity and antimicrobial activities of the fungal endophyte community associated with the traditional Brazilian medicinal plant *Solanum cernuum* Vell. (Solanaceae). Can. J. Microbiol. 58: 4-66.

Vilar, L. (2015) O "ouro branco" chamado açúcar. Disponível em <http://seguindopassoshistoria.blogspot.com/2015/07/o-ouro-branco-chamado-acucar.html>.

Vitorello, V. A.; Capaldi, F. R.; Stefanuto, V. A. (2005) Recent advances in aluminum toxicity and resistance in higher plants. Brazilian Journal Plant Physiology. 17:129- 143.

Vorholt, J. (2012) Microbial life in the phyllosphere. Nature Rev. Microbiol. 10:828-840.

- Vilgalys, R., Gonzalez, D. (1990) Organisation of ribosomal DNA in the basidiomycete *Thanatephorus praticola*. *Current Genetics*, 18:277-280.
- Virgilio, S., Bertolini, M. C. (2017). Functional diversity in the pH signaling pathway: an overview of the pathway regulation in *Neurospora crassa* *Current Genetics*, 64(3):529-534.
- Villa, S., Hamideh, M., Weinstock, A., Qasim, M. N., et al. (2020). Transcriptional control of hyphal morphogenesis in *Candida albicans*. *FEMS Yeast Research*.
- Vautard-Mey, G., Fevre, M. (2003) Carbon and pH modulate the expression of the fungal glucose repressor encoding genes. *Current Microbiol.* 46:146-150.
- Walker, G., Stewart, G. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages. *Beverages*. 2(4):30.
- Wang, C., Wang, C. Y., Zhao, X. Q., Chen, R. F. et al., (2013) Proteomic analysis of a high aluminum tolerant yeast *Rhodotorula taiwanensis* RS1 in response to aluminum stress. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1834:1969-1975.
- Wang, X., Gong, Z. (1998) Assessment and analysis of soil quality changes after eleven years of reclamation in subtropical China. *Geoderma*. 81:339-355.
- Wang, Y., Shi, Y., Li, B., Shan, C., Ibrahim, M., Jabeen, A., Xie, G., Sun, G. (2012) Phosphate solubilization of *Paenibacillus polymyxa* and *Paenibacillus macerans* from mycorrhizal and non-mycorrhizal cucumber plants. *African Journal of Microbiology Research*. 6(21):4567-4573.
- Waqas, M., Khan, A. L., Kamran, M., Hamayun, M., Kang, S-M., Kim, Y-H., et al., (2012) Endophytic fungi produce gibberellins and indoleacetic acid and promotes host-plant growth during stress. *Molecules*. 17:10754-10773.
- Watt, D. A. (2003). Aluminium-responsive genes in sugarcane: identification and analysis of expression under oxidative stress. *Journal of Experimental Botany*. 54(385):1163-1174.
- Wei, Y., Zhao, Y., Shi, M., Cao, Z., et al (2018). Effect of organic acids production and bacterial community on the possible mechanism of phosphorus solubilization during composting with enriched phosphate-solubilizing bacteria inoculation. *Bioresource Technology*. 247:190-199.

- Weyens, N., Thijs, S., Popek, R., Witters, N. et al., (2015) The Role of Plant–Microbe Interactions and Their Exploitation for Phytoremediation of Air Pollutants. *Int J Mol Sci* .16:25576-25604.
- Went, F. W. (1935). Auxin, the plant growth-hormone. *The Botanical Review*, 1(5), 162–182. Whitman, W., D. Coleman, and W. Wiebe. (1998) Prokaryotes: the unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:6578-6583.
- Whitelaw, M. A. (1999). Growth promotion of plants inoculated with phosphate solubilizing fungi. *Advances in Agronomy*. 69:99-151.
- Xin, G., Glaweb, D., Doty, S. L., (2009) Characterization of three endophytic, indole-3-acetic acid-producing yeasts occurring in *Populustrees*. *Mycological Research*. 113(9):973-980.
- Wiesenberger, G., Steinleitner, K., Malli, R., Graier, W. F., Vormann, J., Schweyen, R. J., Stadler, J. A. (2007) Mg^{2+} deprivation elicits rapid Ca^{2+} uptake and activates Ca^{2+} /calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*. 6:592.
- White, T., Bruns, T., Lee, S. e Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.J.J.; SNINSKY, J.J. e WITHE, T.J. *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. New York, Academic Press. p.315-322.
- Wadt, P. G. S. (2002) Manejo de solos ácidos do Estado do Acre. Rio Branco: Embrapa-Rio Branco: Embrapa Acre; 2002. 28p. (Embrapa Acre. Documentos, 79).
- Weijman, A. C. e Rodrigues de Miranda, L. (1983). Xylose distribution within and taxonomy of the genera *Bullera* and *Sporobolomyces*. *Antonie Leeuwenhoek* 49, 559-562
- Weijman, A. C., Rodrigues de Miranda, L. (1988). Carbohydrate patterns of *Candida*, *Cryptococcus* and *Rhodotorula* species. *Antonie Leeuwenhoek* 54, 535-543.
- Wahengbam Romi; Keisam;, S.; Ahmed;, G.; Jeyaram, K. Reliable (2014) differentiation of *Meyerozyma guilliermondii* from *Meyerozyma caribbica* by

internal transcribed spacer restriction fingerprinting. BMC Microbiology, v. 14, n. 54,

Walker JF, Miller OK, Horton JL. 2008. Seasonal dynamics of ectomycorrhizal fungus assemblages on oak seedlings in the southeastern Appalachian Mountains. Mycorrhizia 19: 123-132

Winner, H. S.; Hurley, R. (1964) *Candida albicans*. London: Churchill.

Walker, T. S., Bais, H. P., Grotewold, E., Vivanco, J. M. (2003) Root exudation and rhizosphere biology. Plant Physiol 132:44-51.

Xiao, C., Chi, R., Pan, X., Liu, F., e He, J. (2012). Rock phosphate solubilization by four yeast strains. Annals of Microbiology. 63(1):173-178.

Xin, G., Glawe, D., Doty, S. L. (2009) Characterization of three endophytic, indole-3-acetic acid-producing yeasts occurring in Populus trees. Mycol Res. 113:973-80

Xia, J., Yamaji, N., Kasai, T., Ma J. F. (2010) Plasma membranelocalized transporter for aluminum in rice, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107(43):18381-18385.

Yamamoto, Y., Kobayashi, Y., Devi, S. R., Rikiishi, S., Matsumoto, H. (2002) Aluminum toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and the production of reactive oxygen species in plant cells. Plant Physiol. 128:63-72.

Yang, Z., Chen, J., Dou, R., Gao, X., et al., (2015) Nanoparticles on Two Crop Plants, Maize (*Zea mays L.*) and Rice (*Oryza sativa L.*). Int. J. Environ. Res. Public Health. 12:15100-15109.

Younas, M. S., Butt, M.S., Pasha I. and Shahid, M. (2014) Development of zinc fortified chitosan and alginate based coatings for apricot. Pak. J. Agri. Sci. 51 1033-1039.

Yu, P. H., Chen, C-C, Wu, L. (1970) Production of indoleacetic acid by *Nectriapterospermisaw*. Bot BulAcadSinica. 11:98-104.

Yan, F., Schubert, S., Mengel, K. (1992) Effect of low root medium pH on net proton release, root respiration, and growth of corn (*Zea mays L.*) and broad bean (*Vicia faba L.*). Plant Physiol, 99: 415-421.

- Yan, F., Feuerle, R., Schaffer, S., Fortmeier, H., Schubert, S. (1998) Adaptation of Active Proton Pumping and Plasmalemma ATPase Activity of Corn Roots to Low Root Medium pH. *Plant Physiol.* 117: 311-319.
- Zhang, R., Wang, B., Ouyang, J., Li, J., Wang, Y. (2008) *Arabidopsis* indole synthase, a homolog of tryptophan synthase alpha, is an enzyme involved in the trp-independent indole-containing metabolite biosynthesis. *J Integr Plant Biol.* 50:1070-1077.
- Zhang, S., Zhou, J., Wang, G., Wang, X., Liao, H. (2015) The role of mycorrhizal symbiosis in aluminum and phosphorus interactions in relation to aluminum tolerance in soybean. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1-11.
- Zakharova, E. A., Shcherbakov, A. A., Brudnik, V. V., Skripko, N. G., Bulkhin, N. S., Ignatov, V. V. (1999) Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*. *Eur J Biochem.* 259:572-576.
- Zilber-Rosenberg, I., e Rosenberg, E. (2008). Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiology Reviews.* 32(5):723-735.
- Zhao, Z., Ma, J. F., Sato, K., e Takeda, K. (2003) Differential Al resistance and citrate secretion in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Planta.* 217:794-800.
- Zhao, J., Zhong L., Zou, L., Zhang, C. et al., (2014) Efficient Promotion of the Sprout Growth and Rutin Production of Tartary Buckwheat by Associated Fungal Endophytes. *Cereal Research Communications.* 42(3):401-412.
- Zheng, S. J., Ma, J. F., Matsumoto, H. (1998) Continuous secretion of organic acids is related to aluminum resistance during relatively long-term exposure to aluminum stress. *Physiologia Plantarum, Oxford.* 103(2):209-214.
- Zhao, X.J., Sucoff, E., Stadelmann, E.J. (1987) Al^{3+} and Ca^{2+} alteration of membrane permeability of *Quercus rubra* root cortex cells. *Plant Physiology, Minneapolis,* 83:159-162.
- Zel, J., Svetek, J., Crne, H., et al., (1993) Effects of Aluminum on membrane fluidity of the micorrryzal fungus *Amanita muscaria*. *Physiol. Plant.* 89:172-176.

APÊNDICES

Apêndice A: Árvore Filogenética, gerada a partir do sequenciamento da região ITS (Internal Transcribed Spacer) das leveduras isoladas do colmo de cana-de-açúcar.

Apêndice A: Tabela 4. Espécies de leveduras depositadas no banco de dados^a para a região ITS^b				
Espécie	Isolado	Número de Acesso^c	Origem^d	Local^e
<i>Hanseniaspora clermontiae</i>	CBS 8822	AJ512441	Podridão do Caule de <i>Clermontia</i> sp.	Havaí
	CBS 8821 ^T	AJ512442	Podridão do Caule de <i>Clermontia</i> sp.	Havaí
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	CBS 95	AJ512427	Fermentação de tomates em conserva	Holanda
	CBS 465 ^T	AJ512433	Unha infectada	África do Sul
<i>Hanseniaspora lachancei</i>	CBS 8818 ^T	AJ512439	Suco de Agave Fermentado	México
	CBS 8819	KY103528	<i>Drosophila</i> sp.	México
<i>Hanseniaspora meyeri</i>	CBS 8734 ^T	AJ512436	Drosofilídeos em <i>Sapindus</i> sp.	Havaí
	CBS 8815	AJ512438	Frutos de <i>Sapindus</i> sp.	Havaí
<i>Hanseniaspora occidentalis</i> var. <i>occidentalis</i>	CBS 2592 ^T	Solo	Ilhas Virgens	AJ512429
	CBS 2569	Solo	Brasil	AJ973088
<i>Hanseniaspora occidentalis</i> var. <i>citrica</i>	CBS 6783 ^T	Suco de Laranja	Itália	AJ973092
	CBS 9922	Laranja	Argentina	AJ973095
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	CBS 8733 ^T	Raiz de <i>Opuntia ficus-indica</i>	Havaí	AJ512435
	CBS 8820	Raiz de <i>Opuntia ficus-indica</i>	Havaí	AJ512440

^a: ITS – internal transcribed spacer do RNAr.

^b: Banco de dados – NCBI (National Center for Biotechnology Information) – <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>

^c: Número de acesso das espécies depositadas no banco de dados.

^d: Material de origem que a levedura foi isolada.

^e: Localidade geográfica que a levedura foi isolada.

^T – Sequências de nucleotídeos equivalentes à região ITS, depositadas no banco de dados e relacionadas à espécie tipo (culture from type material).

Apêndice A: Tabela 4. Continuação

Espécie	Isolado	Número de Acesso ^c	Origem ^d	Local ^e
<i>Hanseniaspora osmophila</i>	CBS 313 ^T	Uva	Alemanha	AJ512431
	CBS 1999	Solo	-	KY103543
<i>Hanseniaspora pseudoguilliermondii</i>	CBS 8772 ^T	Suco de Laranja	EUA	AJ512437
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	CBS 314 ^T	Uva Moscatel	Ucrânia	AJ512432
	CBS 2584	-	-	AJ512428
<i>Hanseniaspora valbyensis</i>	CBS 481	Solo	Alemanha	AJ512434
	CBS 479 ^T	-	-	KY103579
<i>Hanseniaspora vineae</i>	CBS 2827	Solo de Vinha	África do Sul	AJ512443
	CBS 2171 ^T	Solo	Itália	KY103581
<i>Hanseniaspora lindneri</i>	CBS 285 ^T	Solo	Java	AJ512430
	NRRL Y-17531	-	-	AY046198
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	ATCC 6260 ^T	-	-	AY939792
	CRYb6	-	-	MK990465
	E22316 ITS	-	-	MK267756
<i>Meyerozyma caribbica</i>	Kw1S7Y2	Bambu	Índia	KF268353
	Kw3S2Y1	Bambu	Índia	KF268354
	CBS 9966	-	Cuba	NR_149348
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	ASU5	Melaço	Egito	KP960516
	NCYC 63 ^T	-	-	MH208711
<i>Rhodotorula kratochvilovae</i>	CBS 5993	-	-	KY104788
	CBS 7294	-	-	KY104787
<i>Rhodotorula glutinis</i>	CBS 2829	-	França	KY104784
	CBS 2891	Couro	França	KY104783
<i>Rhodotorula diobovata</i>	CBS 12082	-	-	KY104778
	CBS 11079	-	-	KY104777
<i>Rhodotorula dairenensis</i>	CBS 7715	Água	Cazaquistão	KY104733
	CBS 2202	Solo	EUA	KY104732
<i>Rhodotorula araucariae</i>	CBS 6031	Material vegetal	Chile	KY104718
	CBS 7797	-	-	KY104717

^c: Número de acesso das espécies depositadas no banco de dados.

^d: Material de origem que a levedura foi isolada.

^e: Localidade geográfica que a levedura foi isolada.

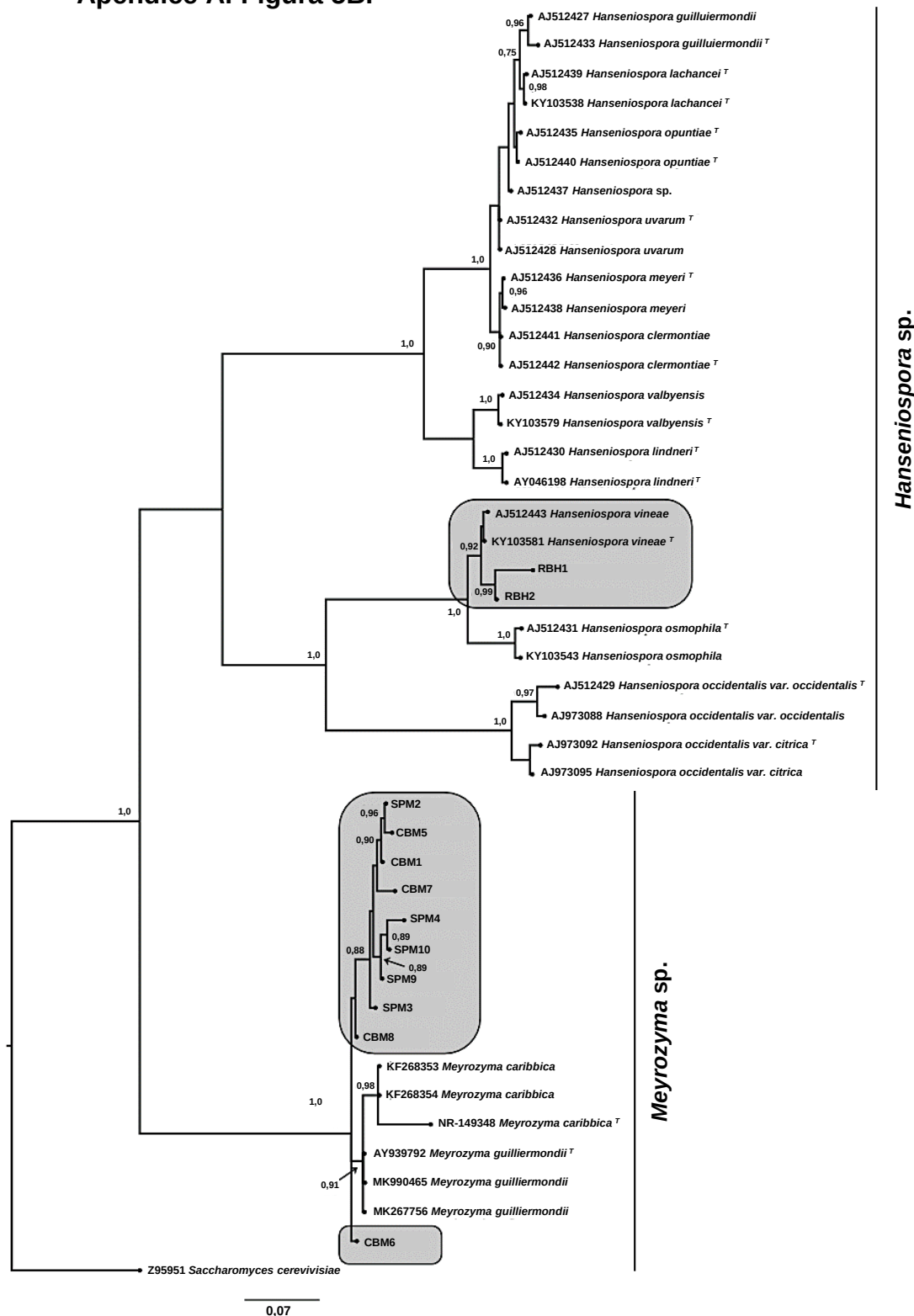
^T – Sequências de nucleotídeos equivalentes à região ITS, depositadas no banco de dados e relacionadas à espécie tipo (culture from type material).

Apêndice A: Figura 5. Árvore Filogenética das leveduras isoladas do colmo de cana-de-açúcar. A árvore Filogenética é uma análise preliminar do gênero (A) *Rhodotorula* sp. e (B) *Hanseniospora* sp. e *Meyerozyma* sp, gerada a partir do sequenciamento da região ITS. Regiões consenso foram comparadas no banco de dados. A similaridade hipotética das leveduras isoladas foi feita baseada na preliminar identidade de leveduras com o banco de dados do BLASTN/NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov>). As sequências obtidas das leveduras isoladas foram adicionadas ao conjunto de sequências obtido no Genbank e alinhadas no programa MUSCLE® (Edgar, 2004) existente no software MEGA v. 5 (Tamura, et al., 2013). Espaços (Gaps) (inserções/deleções) foram tratados como inexistentes. A análise de Inferência Bayesiana (BI) empregando o método da cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) foi realizada utilizando para selecionar o modelo de substituição de nucleotídeos para análise de BI. Os valores de probabilidade posterior (Rannala e Yang, 1996) foram determinados da árvore consenso. As leveduras isoladas foram representadas pelo código da coleção: *Hanseniospora* sp. (RBH1e RBH2); *Meyerozyma* sp. (CBM1, SPM2, SPM3, SPM4, CBM5, CBM6, CBM7, CBM8, SPM9 e SPM10); *Rhodotorula* sp. (RBR1, CBR2, RBR3, SPR4 e RBR5) e realçadas com um círculo. *Saccharomyces cerevisiae* foi utilizada como *outgroup*. Terminais marcados com (T) representam sequências de nucleotídeos equivalentes à região ITS, depositadas no banco de dados (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>) e relacionadas à espécie tipo (*culture from type material*).



(Apêndice A: Figura 5. Continuação)

Apêndice A: Figura 5B.



Apêndice B: Sequências recuperadas no BLASTn/NCBI baseadas na análise da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*)

Apêndice B: Tabela 5. Sequências para a levedura SPC1 (<i>Candida</i> sp.)			
Espécie	Nº de acesso	E-value	Identidade
<i>Candida dosseyi</i>	NR_111406.1	8e-177	98,30
<i>Candida blattae</i>	NR_111407.1	6e-173	97,73
<i>Candida akabanensis</i>	NR_155003.1	1e-150	98,04
<i>Candida flosculorum</i>	NR_137682.1	2e-122	91,33
<i>Candida pseudoflosculorum</i>	NR_165968.1	1e-114	91,89
<i>Candida pseudointermedia</i>	NR_155007.1	1e-110	87,54
<i>Candida thailandica</i>	NR_159560.1	3e-106	90,27
<i>Clavispora reshetovae</i>	NR_137723.1	1e-105	89,93
<i>Candida intermedia</i>	NR_111248.1	1e-104	86,96
<i>Candida suratensis</i>	NR_155008.1	4e-95	93,94

O valor da identidade é dado em porcentagem (%).

Realce – sequência que apresentou maior similaridade de nucleotídeos.

Apêndice B: Tabela 6. Sequências para as leveduras RBC2 e RBC3 (*Candida* sp.)

RBC2				RBC3			
Espécie	Nº de acesso	E-value	Identidade	Espécie	Nº de acesso	E-value	Identidade
<i>Candida parapsilosis</i>	NR_130673.1	0	99,79	<i>Candida parapsilosis</i>	NR_130673.1	0	99,58
<i>Candida hyderabadensis</i>	NR_159741.1	0	97,73	<i>Candida hyderabadensis</i>	NR_159741.1	0	98,14
<i>Candida orthopsilosis</i>	NR_130661.1	0	95,61	<i>Candida orthopsilosis</i>	NR_130661.1	0	94,53
<i>Candida metapsilosis</i>	NR_165186.1	0.0	94,64	<i>Candida metapsilosis</i>	NR_165186.1	0	95,38
<i>Candida margitis</i>	NR_159750.1	1e-180	91,68	<i>Candida margitis</i>	NR_159750.1	5e-180	91,83
<i>Candida jiufengensis</i>	NR_111471.1	5e-175	90,59	<i>Candida cetoniae</i>	NR_132875.1	6e-174	90,34
<i>Candida cetoniae</i>	NR_132875.1	2e-174	90,36	<i>Candida jiufengensis</i>	NR_111471.1	5e-175	90,59
<i>Candida pseudojiufengensis</i>	NR_111473.1	2e-168	89,68	<i>Candida pseudojiufengensis</i>	NR_111471.1	8e-173	90,36
<i>Candida theae</i>	NR_111722.1	1e-155	88,11	<i>Candida theae</i>	NR_111722.1	7e-154	87,91
<i>Nematodospora valgi</i>	NR_132909.1	4e-146	87,31	<i>Nematodospora valgi</i>	NR_132909.1	4e-151	87,96

O valor da identidade é dado em porcentagem (%).

Realce – sequência que apresentou maior similaridade de nucleotídeos.

Apêndice B: Tabela 7. Sequências para as leveduras RBH1 e RBH2 (*Hanseniaspora* sp.)

RBCH1				RBCH1			
Espécie	Nº de acesso	E-value	Identidade	Espécie	Nº de acesso	E-value	Identidade
<i>Hanseniaspora vineae</i>	NR_165975.1	0	97,25	<i>Hanseniaspora vineae</i>	NR_165975.1	0	99,71
<i>Hanseniaspora osmophila</i>	NR_138191.1	0	94,16	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	NR_138191.1	0	96,53
<i>Hanseniaspora occidentalis</i>	NR_138189.1	5e-132	85,32	<i>Hanseniaspora occidentalis</i>	NR_138189.1	5e-142	86,55
<i>Lachancea fermentati</i>	NR_130666.1	2e-95	84,47	<i>Lachancea fermentati</i>	NR_130666.1	1e-108	86,65
<i>Lachancea cidri</i>	NR_165978.1	5e-92	83,88	<i>Lachancea cidri</i>	NR_165978.1	1e-103	85,79
<i>Yueomyces sinensis</i>	NR_159012.1	2e-91	83,65	<i>Lachancea kluyveri</i>	NR_138159.1	2e-101	85,37
<i>Lachancea kluyveri</i>	NR_138159.1	8e-90	83,55	<i>Vanderwaltozyma yarrowii</i>	NR_155996.1	2e-100	87,62
<i>Vanderwaltozyma yarrowii</i>	NR_155996.1	1e-88	85,49	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	NR_111257.1	4e-98	87,86
<i>Lachancea thermotolerans</i>	NR_111334.1	1e-88	83,42	<i>Torulaspora pretoriensis</i>	NR_138200.1	4e-98	87,86
<i>Lachancea meyersii</i>	NR_077162.1	4e-88	83,29	<i>Torulaspora globosa</i>	NR_138238.1	1e-97	87,62

O valor da identidade é dado em porcentagem (%).

Realce – sequência que apresentou maior similaridade de nucleotídeos.

Apêndice B: Tabela 8. Sequências para as leveduras CBM1, SPM2, SPM3 e SPM4 (*Meyerozyma* sp.)

Espécie	Nº de acesso	CBM1	SPM2	SPM3	SPM4
		Identidade	Identidade	Identidade	Identidade
<i>Meyerozyma carophila</i>	NR_152984.1	99,44	99,44	99,44	99,44
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	NR_111247.1	98,54	98,37	98,54	98,37
<i>Meyerozyma smithsonii</i>	NR_111339.1	97,66	97,50	97,66	97,49
<i>Meyerozyma caribbica</i>	NR_149348.1	98,87	98,69	98,87	98,69
<i>Meyerozyma athensensis</i>	NR_111340.1	95,69	95,54	95,69	95,54
<i>Meyerozyma amylolytica</i>	NR_154976.1	93,02	92,89	93,02	92,37
<i>Meyerozyma elateridarum</i>	NR_111350.1	92,40	92,28	92,40	91,77
<i>Meyerozyma neustonensis</i>	NR_152946.1	88,85	88,76	88,85	88,25
<i>Debaryomyces prosopidis</i>	NR_077067.1	88,26	88,28	88,26	87,87
<i>Debaryomyces fabryi</i>	NR_138186.1	88,26	88,28	88,26	87,87

O valor da identidade é dado em porcentagem (%).

O e-value para todas as sequências analisadas foi igual a zero.

Realce – sequência que apresentou maior similaridade de nucleotídeos.

Apêndice B: Tabela 9. Sequências para as leveduras CBM5, CBM7, SPM9 e SPM10 (<i>Meyerozyma</i> sp.)					
Espécie	Nº de acesso	CBM5	CBM7	SPM9	SPM10
		Identidade	Identidade	Identidade	Identidade
<i>Meyerozyma carpophila</i>	NR_152984.1	99,07	99,63	99,63	99,63
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	NR_111247.1	98,01	98,72	98,55	98,55
<i>Meyerozyma smithsonii</i>	NR_111339.1	97,14	97,84	97,67	97,67
<i>Meyerozyma caribbica</i>	NR_149348.1	98,31	99,06	98,87	98,87
<i>Meyerozyma athensensis</i>	NR_111340.1	95,19	95,87	98,87	95,71
<i>Meyerozyma amylolytica</i>	NR_154976.1	92,53	92,68	95,71	92,71
<i>Meyerozyma elateridarum</i>	NR_111350.1	92,94	92,06	92,71	92,10
<i>Meyerozyma neustonensis</i>	NR_152946.1	88,40	88,51	92,10	88,57
<i>Debaryomyces prosopidis</i>	NR_077067.1	87,95	87,93	88,21	88,19
<i>Debaryomyces fabryi</i>	NR_138186.1	87,95	87,93	88,21	88,19

O valor da identidade é dado em porcentagem (%).

O e-value para todas as sequências analisadas foi igual a zero.

Realce – sequência que apresentou maior similaridade de nucleotídeos.

Apêndice B: Tabela 10. Sequências para as leveduras CB6 e CBM8 (*Meyerozyma* sp.)

Espécie	Nº de acesso	CBM6	CBM8
		Identidade	Identidade
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	NR_111247.1	98,73	99,10
<i>Meyerozyma smithsonii</i>	NR_111339.1	97,14	97,50
<i>Meyerozyma carpophila</i>	NR_152984.1	98,32	98,69
<i>Meyerozyma caribbica</i>	NR_149348.1	97,57	97,94
<i>Meyerozyma athensensis</i>	NR_111340.1	95,37	95,72
<i>Meyerozyma amylolytica</i>	NR_154976.1	92,89	93,94
<i>Meyerozyma elateridarum</i>	NR_111350.1	92,44	92,78
<i>Meyerozyma neustonensis</i>	NR_152946.1	88,61	88,93
<i>Debaryomyces prosopidis</i>	NR_077067.1	87,62	97,95
<i>Debaryomyces fabryi</i>	NR_138186.1	87,62	87,95

O valor da identidade é dado em porcentagem (%).

O e-value para todas as sequências analisadas foi igual a zero.

Realce – sequência que apresentou maior similaridade de nucleotídeos.

Apêndice B: Tabela 11. Sequências para as leveduras *Rhodotorula* sp.

Espécie	Nº de acesso	RBR1	CBR2	RBR3	SPR4	SPR5
		Identidade	Identidade	Identidade	Identidade	Identidade
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	NR_073296.1	99,47	98,47	99,14	98,95	98,95
<i>Rhodotorula alborubescens</i>	NR_153197.1	99,24	98,72	98,89	99,43	99,43
<i>Rhodotorula sphaerocarpa</i>	NR_073269.1	94,06	94,12	93,84	93,55	93,57
<i>Rhodotorula taiwanensis</i>	NR_157462.1	94,47	93,23	94,39	94,65	94,65
<i>Rhodotorula araucariae</i>	NR_073277.1	90,99	90,70	94,39	90,99	90,99
<i>Rhodotorula paludigena</i>	NR_073265.1	90,72	90,56	90,89	90,71	90,71
<i>Rhodotorula kratochvilovae</i>	NR_073282.1	90,81	90,53	90,38	90,81	90,81
<i>Rhodotorula glutinis</i>	NR_073294.1	90,07	89,93	90,03	89,58	89,60
<i>Rhodotorula graminis</i>	NR_073273.1	89,91	89,77	89,88	89,43	89,45
<i>Rhodotorula babjevae</i>	NR_077096.1	89,91	89,77	89,88	89,43	89,45

O valor da identidade é dado em porcentagem (%).

O e-value para todas as sequências analisadas foi igual a zero.

Realce – sequência que apresentou maior similaridade de nucleotídeos.

Apêndice C: Alinhamento múltiplo de sequências recuperadas no BLASTn/NCBI baseado na análise da região ITS (Internal Transcribed Spacer)

Apêndice C: Figura 6. Alinhamento MUSCLE para as leveduras *Candida* sp.. (A) A sequência obtida da levedura SPC1 foi confrontada com a sequência da levedura da espécie *Candida dosseyi* referenciada como uma espécie tipo (*type-strain* – número de acesso KY102054.1). As sequências obtidas das leveduras RBC2 (B) e RBC3 (C) foram confrontadas individualmente com a sequência da levedura da espécie *Hanseniaspora vinea* referenciada como uma espécie tipo (*type-strain* – número de acesso número de KY102290.1). As sequências foram alinhadas no programa MUSCLE® (Edgar, 2004) existente no software MEGA X (Kumar et al. 2018) e exportadas para o programa de alinhamento ClustalW 2.1. (Larkin et al., 2007).

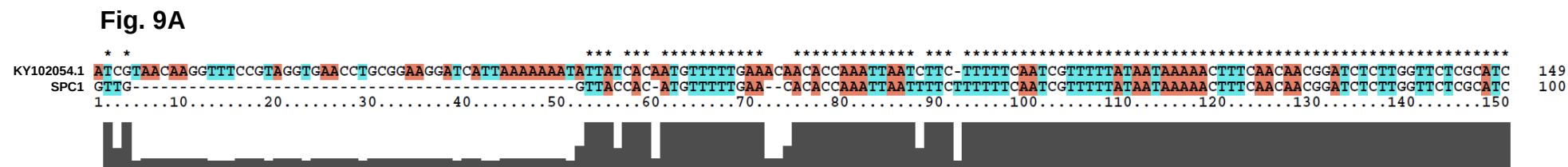


Fig. 9A - Continuação

 KY102054.1 GATGAAGAA CGCAGCGAATTGCGATACGTAATATGACTTGCAGACGTGAATCATTGAATCTTTGAA CGCACATTGCGCCTTGAGGTATTCTCAAGGCATGCCGTGTTTGAGCGTCGGCTCCTTTCAAA CCCTAGGGTTTGGCTTTGCCTC 299
 SPC1 GATGAAGAA CGCAGCGAATTGCGATA CGTAATATGACTTGCAGACGTGAATCATTGAATCTTTGAA CGCACATTGCGCCTTGAGGTATTCTCAAGGCATGCCGTGTTTGAGCGTCGGCTCCTTTCAAA CCCTAGGGTTTGGCTTTGCCTC 250
160.....170.....180.....190.....200.....210.....220.....230.....240.....250.....260.....270.....280.....290.....300



 KY102054.1 CGAAATATTA GGATCTAATGCAATACGTTTCATTTAATCCAAATTCCTTCGCCCCCAAATCAGGTAA GACTACCCGCTGAAC TTAA GCATATCAATAAGCGGA --- 401
 SPC1 CGAAATATTA GGATCTAATGCAATACGTTTCATTTAATCCAAATTCCTTCGCCCCCAAATCAGGTAA GACTACCCGCTGAAC TTAA GCATATCAATAAGCGGA GGA 356
310.....320.....330.....340.....350.....360.....370.....380.....390.....400.....



Síteos Conservados: 345/406

Fig. 9B

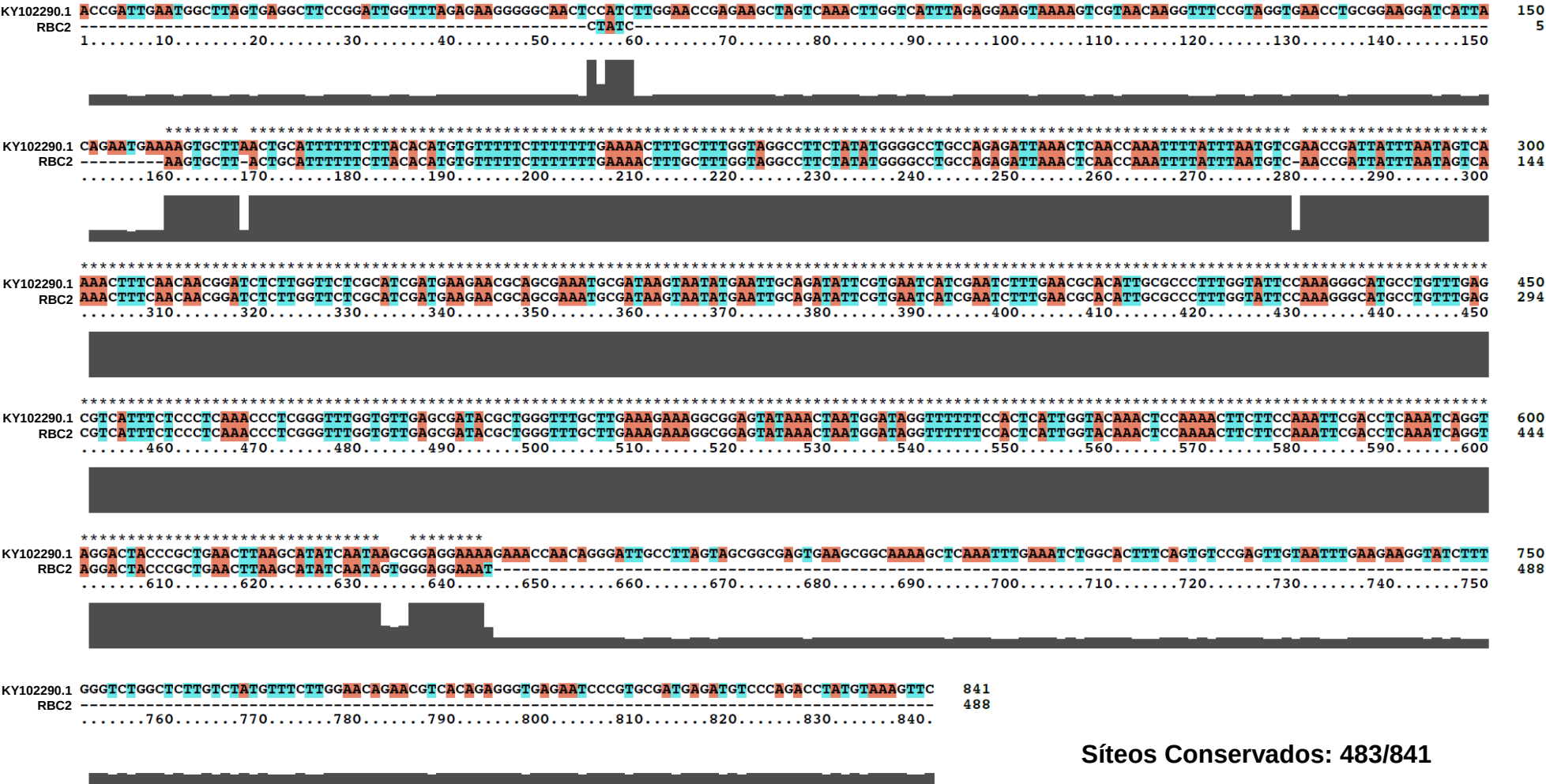
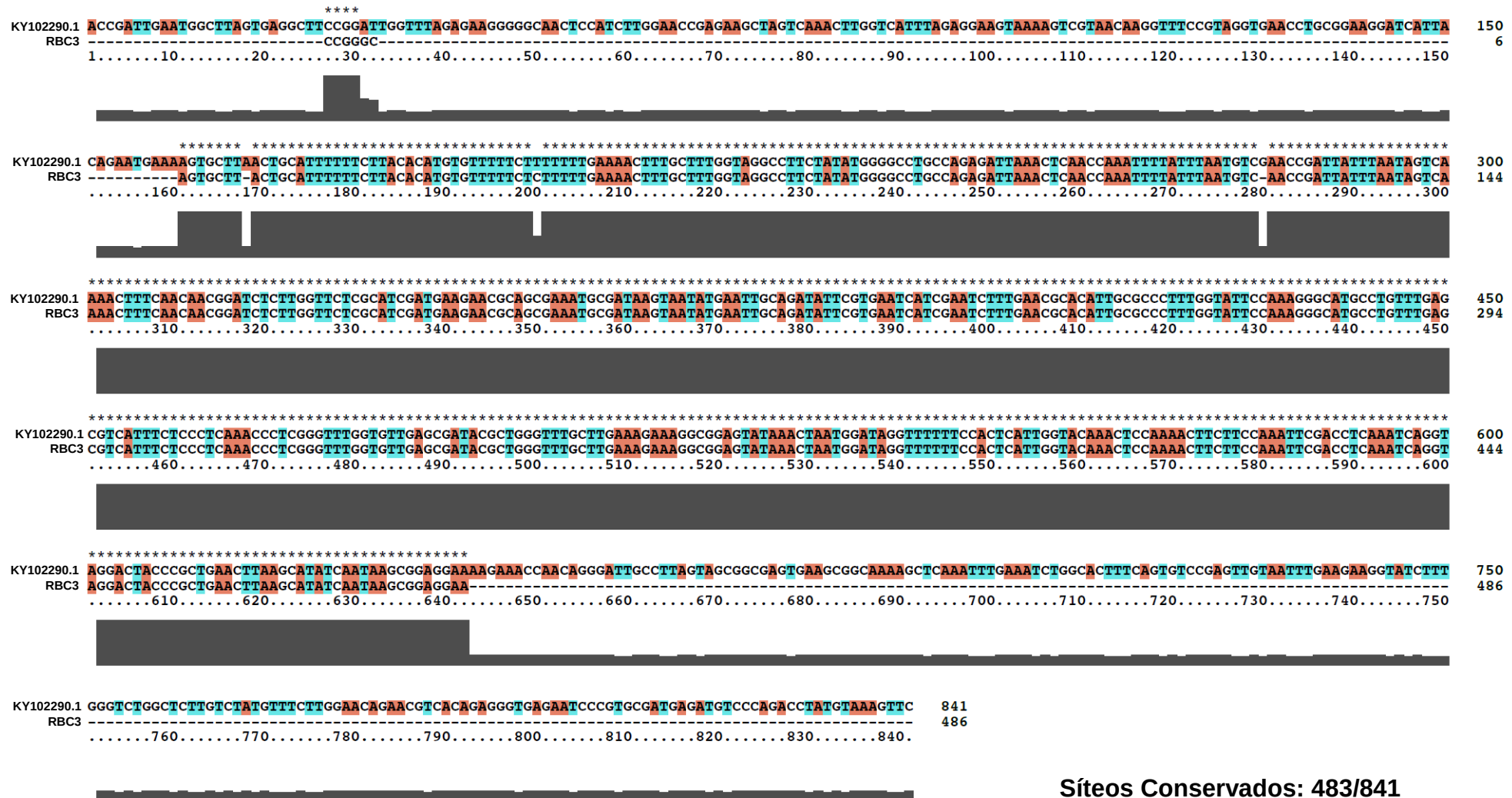


Fig. 9C



Apêndice: Figura 7. Alinhamento MUSCLE para as leveduras *Hanseniaspora* sp. com *Hanseniaspora vinea*. As sequências obtidas das leveduras RBH1 e RBH2 foram confrontadas individualmente com a sequência da levedura da espécie *Hanseniaspora vinea* referenciada como uma espécie tipo (*type-strain* – número de acesso NR_165975.1). A sequência de referência foi a que apresentou maior similaridade de nucleotídeos no programa BLASTN/NCBI para ambas leveduras. As sequências foram alinhadas no programa MUSCLE® (Edgar, 2004) existente no software MEGA X (Kumar et al., 2018) e exportadas para o programa de alinhamento ClustalW 2.1. (Larkin et al., 2007).

Fig. 10A

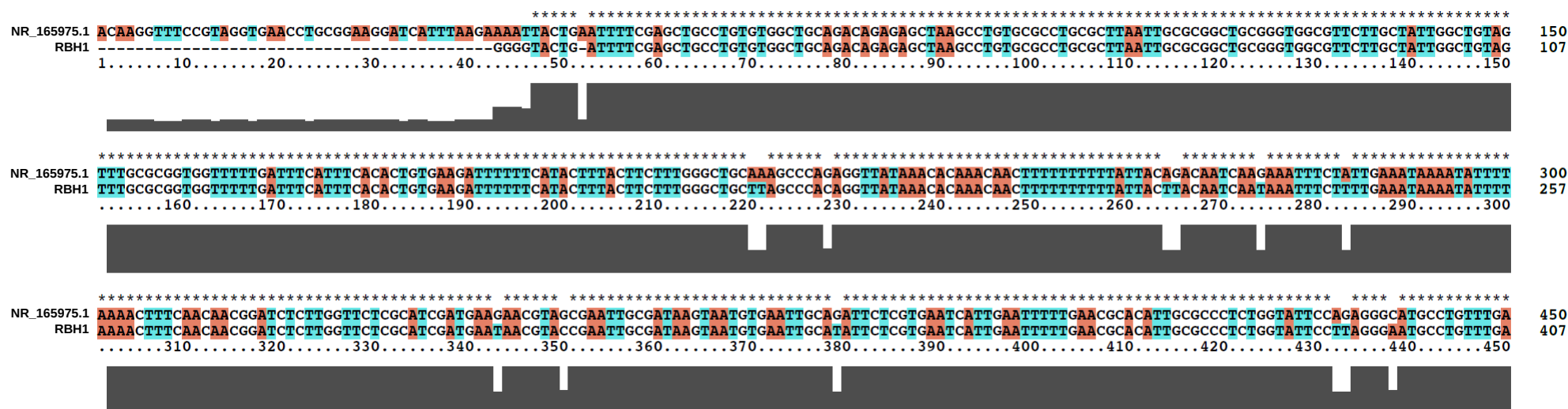


Fig. 10A - Continuação

NR_165975.1 GCGTCATTTCCCTTCTCAAAAACCCAGTTTTTGGTTGTGAGTGATCTCTGTTACAGGGTTAACTTGAAAATGCTATGCCCATTGGCTGCCCTTCTCTGAGGGGACTGCGCGTCTGTGCAGGATGTAAACCAATGTATTTAGGTATTCAT 600
RBH1 GCGTCATTTCCCTTCTCAAAAACCCAGTTTTTGGTTGTGAGTGATCTCTGTTACAGGGTTAACTTGAAAATGCTATGCCCATTGGCTGCCCTTCTCTGAGGGGACTGCGCGTCTGTGCAGGATGTAAACCAATGTATTTAGGTATTCAT 557
.....460.....470.....480.....490.....500.....510.....520.....530.....540.....550.....560.....570.....580.....590.....600



NR_165975.1 ACCAACTTTCATTGTGCGCGTCTTATGCAGTTGCAGTCCACCCAACTCGGACACACTGGGCTGGCTGGGCCAACAGTATTCATAAAG-TTGACCTCAAATCAGGTAGGAGTACCCGCTGAACCTAAGCATATCAA----- 735
RBH1 ACCAACTTTCATTGTGCGCGTCTTATGCAGTTGCAGTCCACCCAACTCGGACACACTGGGCTGGCTGGGCCAACAGTATTCATAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGAGTACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCCGGAGGGAA 707
.....610.....620.....630.....640.....650.....660.....670.....680.....690.....700.....710.....720.....730.....740.....750



NR_165975.1 ---- 735
RBH1 GGAA 711
....



Sítios Conservados: 671/754

Fig. 10B

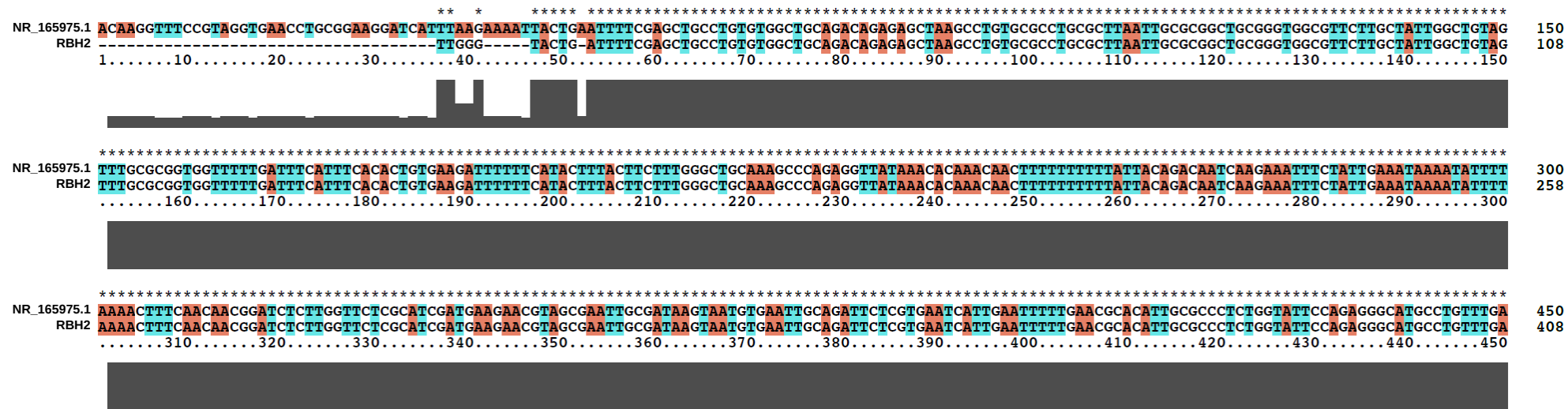


Fig. 10B - Continuação

NR_165975.1 GCGTCATTTCCCTTCTCAAAAACCCAGTTTTTGGTTGTGAGTGATACTCTGTTACAGGGTTAACTTGAAAAATGCTATGCCCATTTGGCTGCCCTTCTCTGAGGGGACTGCGCGTCTGTGCAGGATGTAAACCAATGTATTTAGGTATTCAT 600
RBH1 GCGTCATTTCCCTTCTCAAAAACCCAGTTTTTGGTTGTGAGTGATACTCTGTTACAGGGTTAACTTGAAAAATGCTATGCCCATTTGGCTGCCCTTCTCTGAGGGGACTGCGCGTCTGTGCAGGATGTAAACCAATGTATTTAGGTATTCAT 558
.....460.....470.....480.....490.....500.....510.....520.....530.....540.....550.....560.....570.....580.....590.....600



NR_165975.1 ACCAACTTTTCATTGTGCGCGTCTTATGCAGTTGCAGTCCACCCAACTCGGACACACTGGGCTGGCTGGGCCAACAGTATTCATAAAG-TTGACCTCAAATCAGGTAGGAGTACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAA----- 735
RBH1 ACCAACTTTTCATTGTGCGCGTCTTATGCAGTTGCAGTCCACCCAACTCGGACACACTGGGCTGGCTGGGCCAACAGTATTCATAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGAGTACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCCGGAAGGAAA 708
.....610.....620.....630.....640.....650.....660.....670.....680.....690.....700.....710.....720.....730.....740.....750



NR_165975.1 -- 735
RBH1 GA 710
..

Síteos Conservados: 691/754



Apêndice C: Figura 8. Alinhamento MUSCLE para as leveduras *Rhodotorula sp.* com *Rhodotorula mucilaginosa*. As sequências obtidas das leveduras *Rhodotorula sp.* –RBR1 (A), CBR2 (B), RBR3 (C), SPR4 (D) e SPR5 (E) – foram confrontadas com a sequência da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* da espécie referenciada como uma espécie tipo (*type-strain* – número de acesso NR_073296.1). A sequência de referência foi a que apresentou maior similaridade de nucleotídeos no programa BLASTN/NCBI. As sequências foram alinhadas no programa MUSCLE® (Edgar, 2004) existente no software MEGA X (Kumar et al., 2018) e exportadas para o programa de alinhamento ClustalW 2.1. (Larkin et al., 2007). O gráfico indica o grau de conservação dos nucleotídeos (sítios conservados) das sequências alinhadas.

Fig. 11A

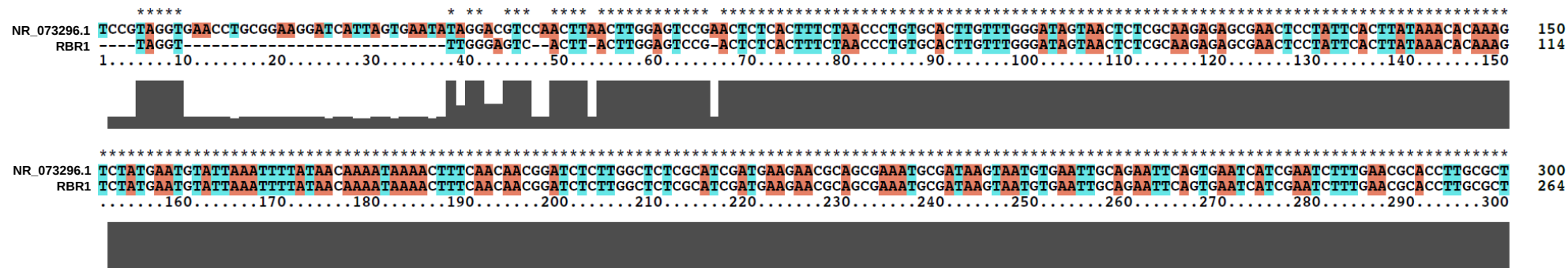


Fig. 11A - Continuação

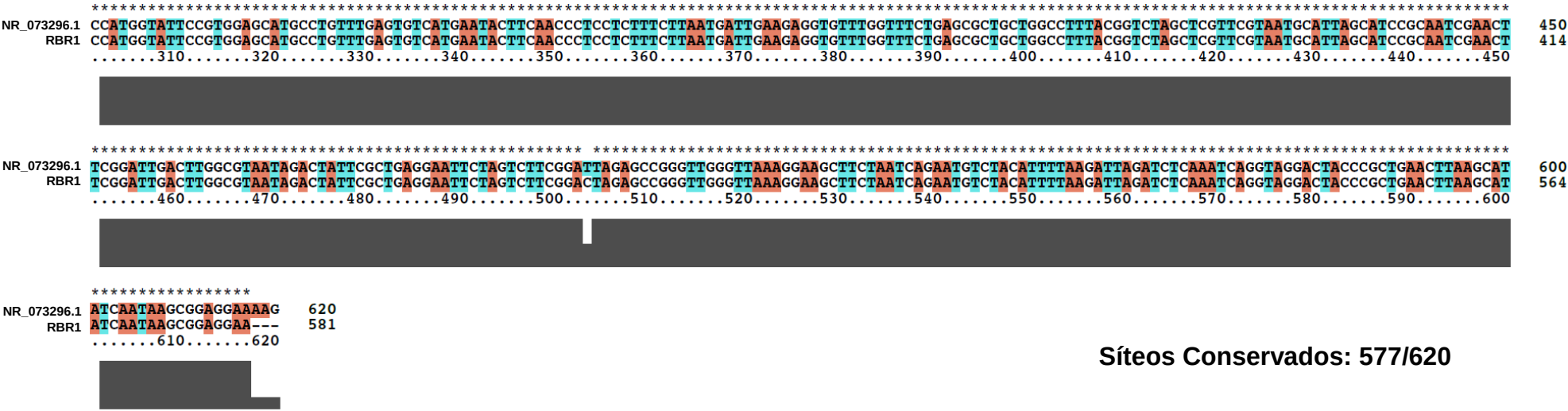


Fig. 11B

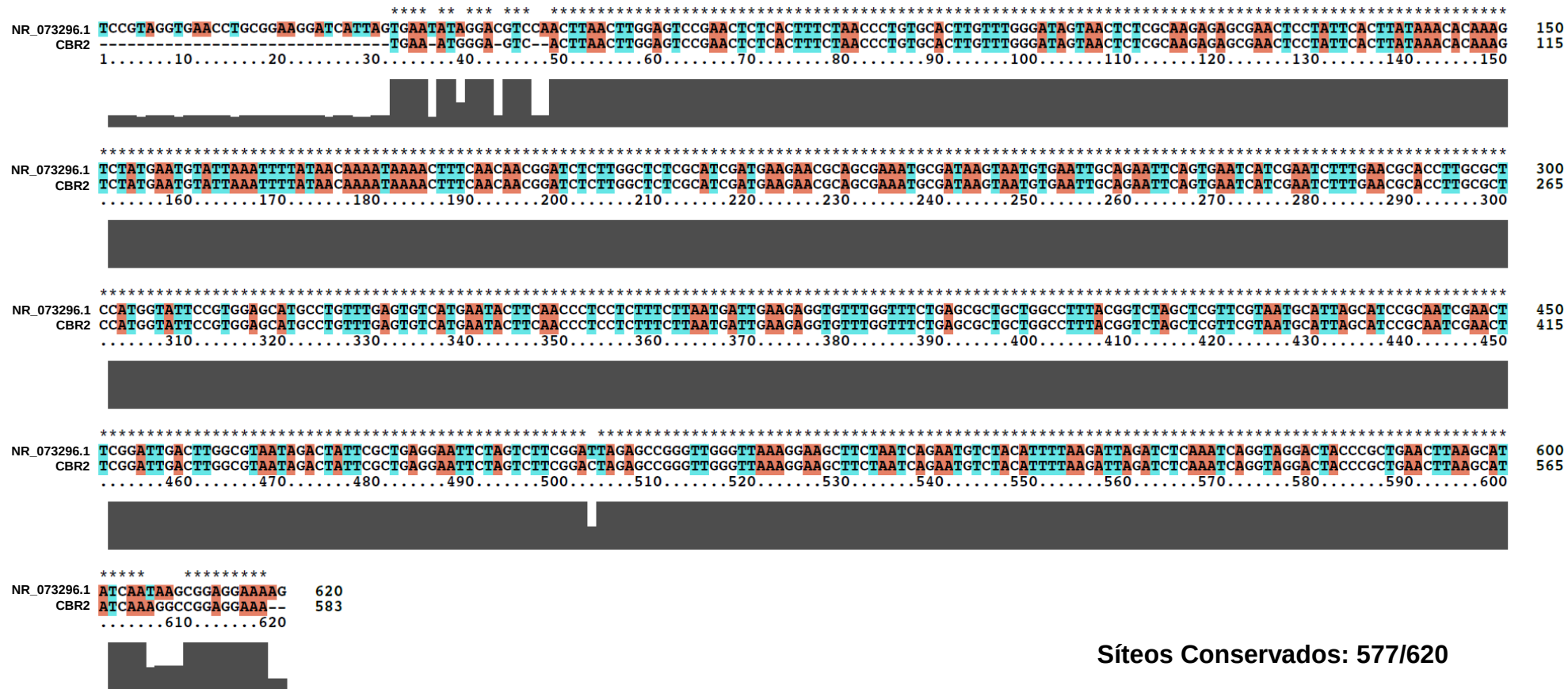


Fig. 11C

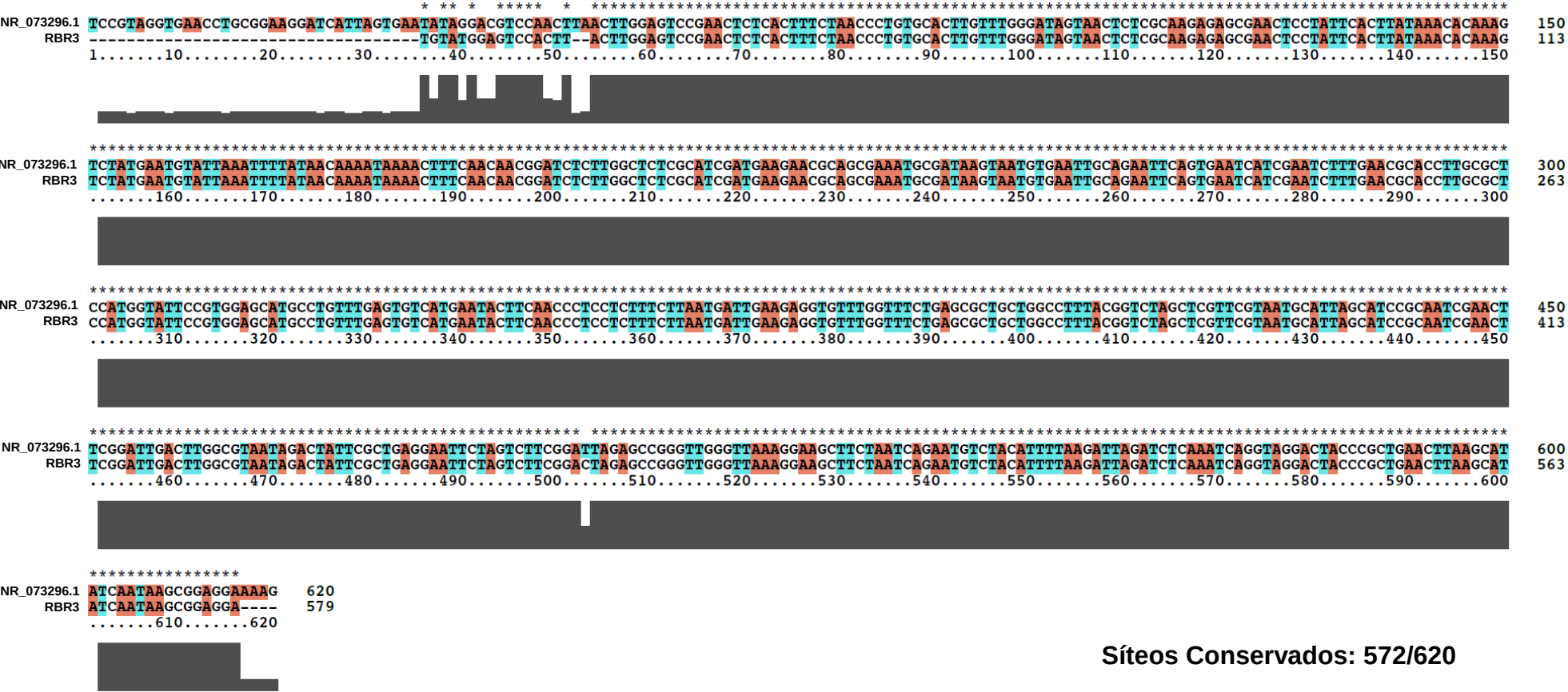


Fig. 11D

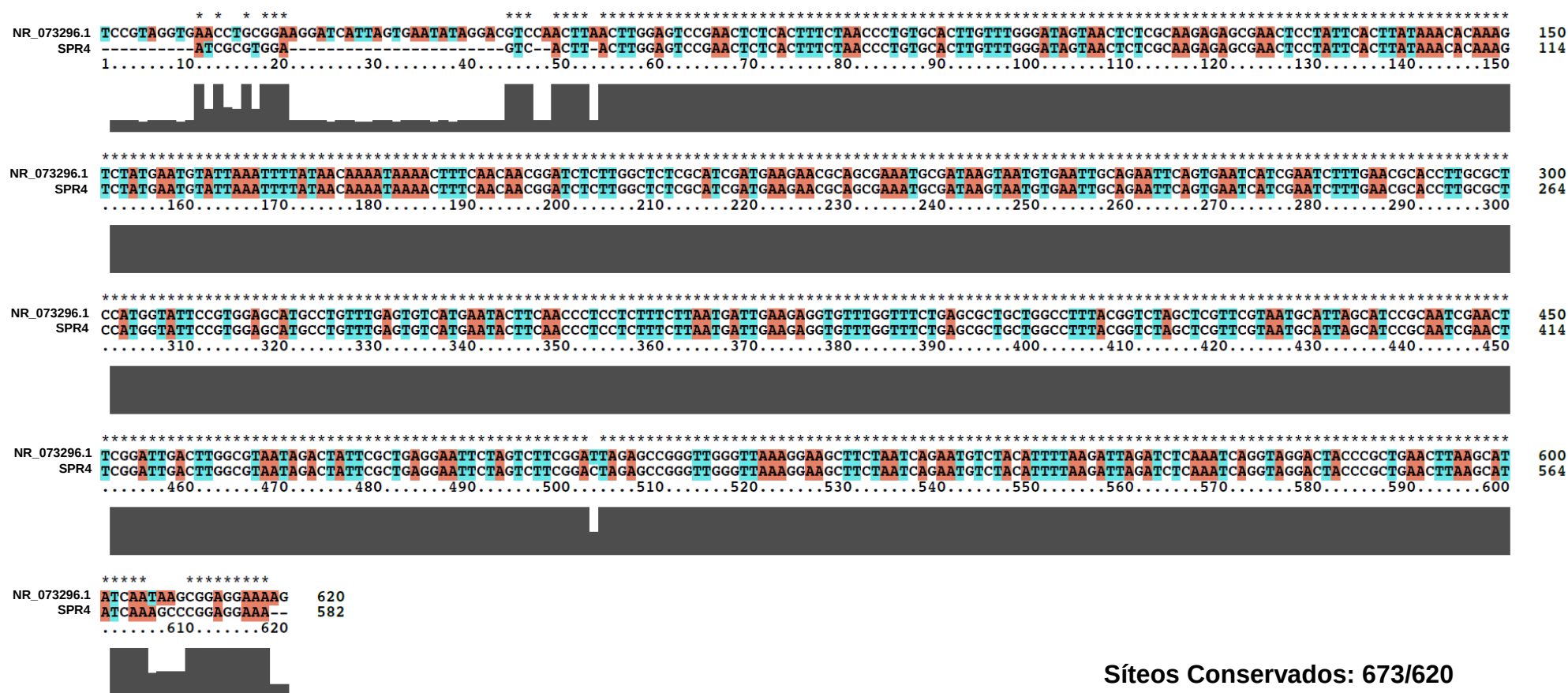
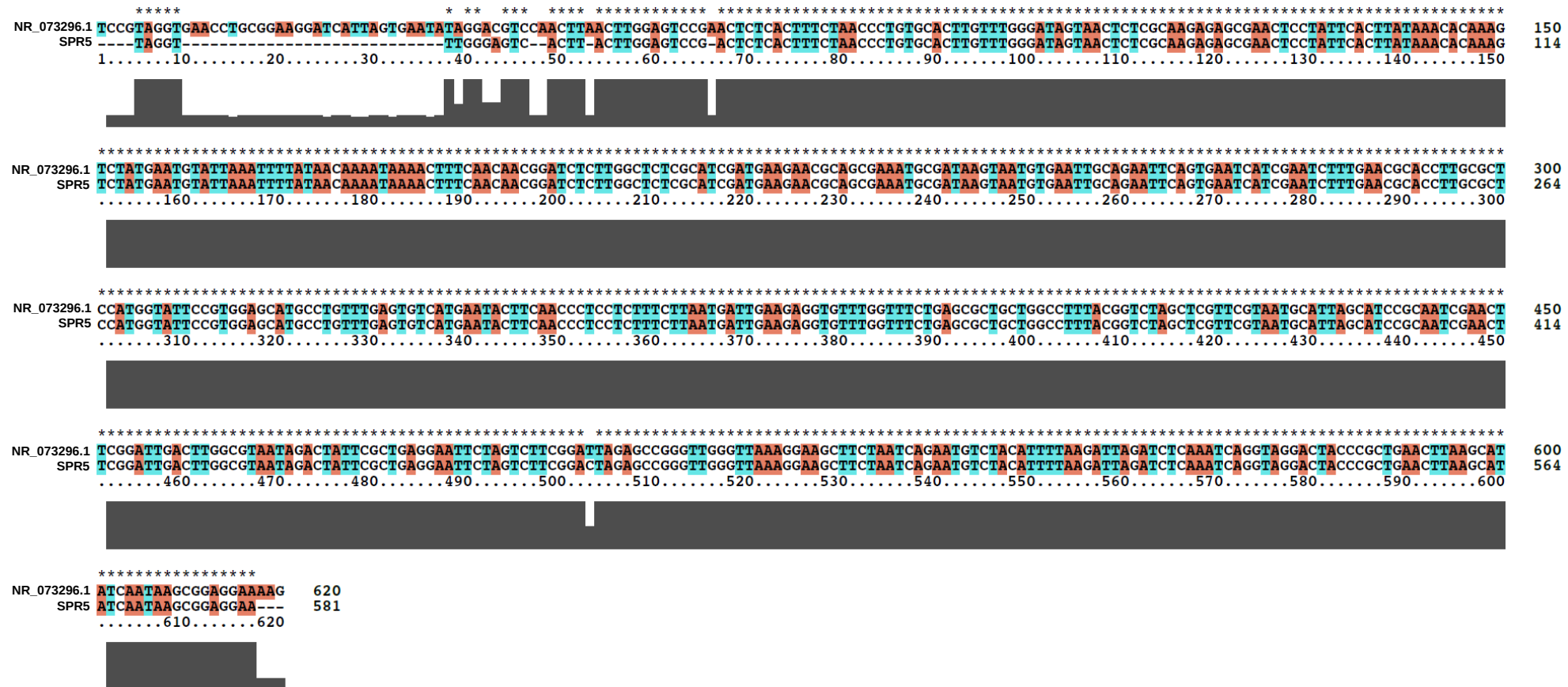


Fig. 11E



Síteos Conservados: 574/620

Apêndice C: Tabela 12. Grau de conservação dos nucleotídeos (sítios conservados) obtidos no alinhamento MUSCLE para as leveduras *Meyerozyma* sp. baseados na região ITS (*Internal Transcribed Spacer*)

Leveduras isoladas	Sítios conservados		
	Leveduras de referência (<i>type-strain</i>)		
	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	<i>Meyerozyma caribbica</i>	<i>Meyerozyma carpophila</i>
CBM1	567/608	534/678	533/575
SPM2	564/608	534/678	533/576
SPM3	562/608	533/678	533/575
SPM4	562/609	533/609	533/576
CBM5	562/610	534/677	534/677
CBM6	567/610	526//680	527/579
CBM7	560/690	535/678	534/677
CBM8	568/608	529/678	533/678
SPM9	564/608	533/678	533/678
SPM10	564/608	535/678	534/575

- No alinhamento NBLAST, as leveduras isolas CBM1, SPM2, SPM3, SPM4, CBM5, CBM7, SPM9 e SPM10 obtiveram a maior similaridade com a levedura da espécie *Meyerozyma guilliermondii* (número de acesso NR_111247.1).

- No alinhamento NBLAST, as leveduras isolas CBM6 e CBM8 obtiveram a maior similaridade com a levedura da espécie *Meyerozyma carpophila* (número de acesso NR_152984.1).

- As sequências obtidas das leveduras *Meyerozyma* sp. foram confrontadas com a sequência da espécie tipo (*type-strain*): *Meyerozyma guilliermondi* (número de acesso AY939792.1), *Meyerozyma caribbica* número de acesso NR_149348.1) e *Meyerozyma carpophila* (número de acesso NR_152984.1).

- As sequências foram alinhadas no programa MUSCLE® (Edgar, 2004) existente no software MEGA X (Kumar et al., 2018) Os sítios conservados de nucleotídeos foram obtidos a partir do alinhamento entre as sequências.

Apêndice D: Alinhamento múltiplo de sequências recuperadas no BLASTn/NCBI baseada na análise do domínio D1/D2 da subunidade maior do 28s/LSU (*large subunit*)

Apêndice D: Figura 9. Alinhamento MUSCLE do domíni D1/D2 – 28s/LSU para as leveduras *Candida* sp. (A) A sequência obtida da levedura SPC1 foi confrondada com a sequência da levedura da espécie *Candida dosseyi* referenciada como uma espécie tipo (*type-strain* – número de acesso NG_055374.1). A sequência obtida da levedura RBC2 (B) foi confrondada i com a sequência da levedura da espécie *Candida parapsilosis* referenciada como uma espécie tipo (*type-strain* – número de acesso número de NG_054833.1). As sequências foram alinhadas no programa MUSCLE® (Edgar, 2004) existente no software MEGA X (Kumar et al., 2018) e exportadas para o programa de alinhamento ClustalW 2.1. (Larkin et al., 2007). O gráfico indica o grau de conservação dos nucleotídeos (sítios conservados) das sequências alinhadas.

Fig. 12A

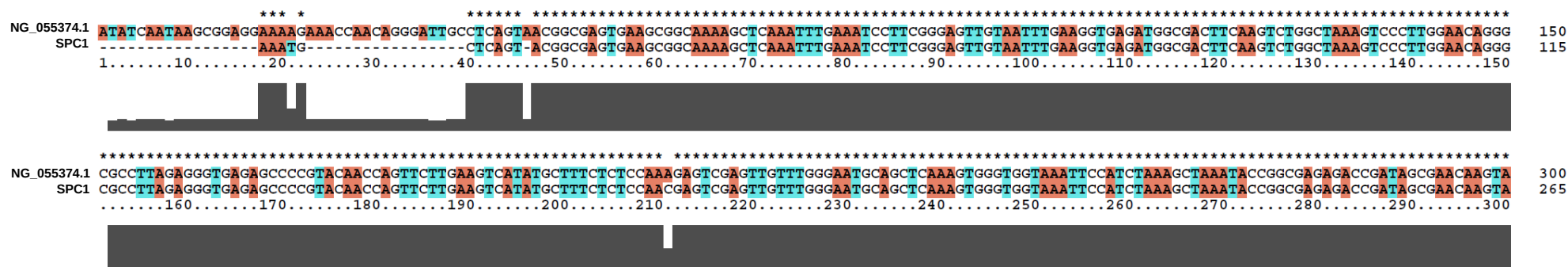


Fig. 12A - Continuação

```

*****
NG_055374.1 CCGTGAGGGAAAATGAAAAACAATTTGAAAAAGAGTGAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAAGGGCTTGCAAGCAGACACAAACCTTCGTGGTTGGGCCAGCATCGGTTGCTAGGGGTGGATAAGGCCGGCGGGAATGTAGCTTCC 450
SPC1 CCGTGAGGGAAAATGAAAAACAATTTGAAAAAGAGTGAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAAGGGCTTGCAAGCAGACACAAACCTTCGTGGTTGGGCCAGCATCGGTTGCTAGGGGTGGATAAGGCCGGCGGGAATGTAGCTTCC 415
.....310.....320.....330.....340.....350.....360.....370.....380.....390.....400.....410.....420.....430.....440.....450

```



```

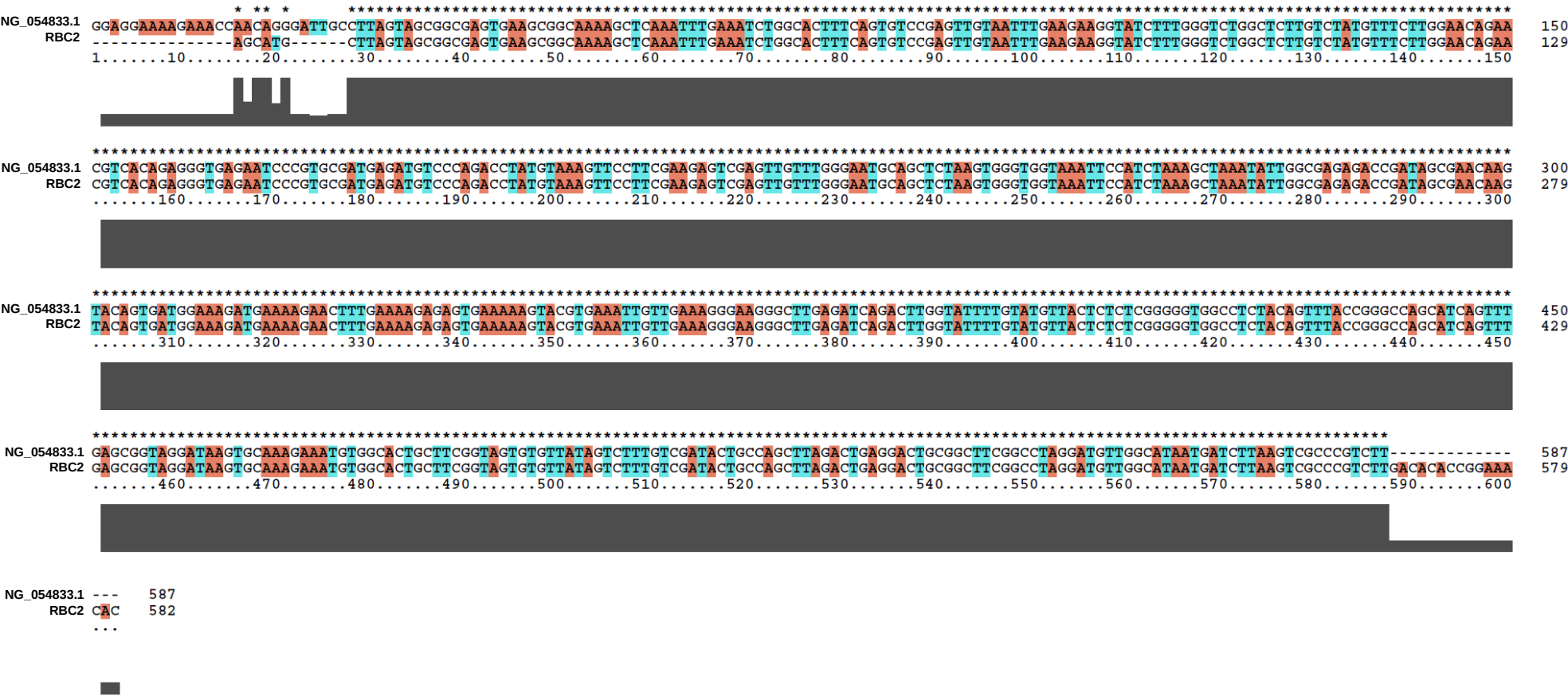
***** * *****
NG_055374.1 TCGGAAGTATTATATCCCGCTGAGATACACCAACCGGCGACCGAGGGCCTGCGATTCTAAATCAAGGATGCTGGCGTAATGGTTGCAGGCCGC----- 542
SPC1 TCGGAAGTATTATATCCCGCTGAGATACACCAACCGGCGACCGAGGGCCTGCGATTTTAAATCAAGGATGCTGGCGTAATGGTTGCAGGCCGCCGCTTTGCAACCCCGGAACA 530
.....460.....470.....480.....490.....500.....510.....520.....530.....540.....550.....560.....

```



Sítios Conservados: 503/565

Fig. 12B



Sítios Conservados:564/603

Apêndice D: Figura 10. Alinhamento MUSCLE do domíni D1/D2 – 28s/LSU para as leveduras *Hanseniaspora* sp. com *Hanseniaspora vinea*. As sequências obtidas das leveduras RBH1 (A) e RBH2 (B) foram confrondadas individualmente com a sequência da levedura da espécie *Hanseniaspora vinea* referenciada como uma espécie tipo (*type-strain* – número de acesso NG_055415.1). A sequência de referência foi a que apresentou maior similaridade de nucleotídeos no programa BLASTN/NCBI para ambas leveduras. As sequências foram alinhadas no programa MUSCLE® (Edgar, 2004) existente no software MEGA X (Kumar et al., 2018) e exportadas para o programa de alinhamento ClustalW 2.1. (Larkin et al., 2007). O gráfico indica o grau de conservação dos nucleotídeos (sítios conservados) das sequências alinhadas.

Fig. 12A

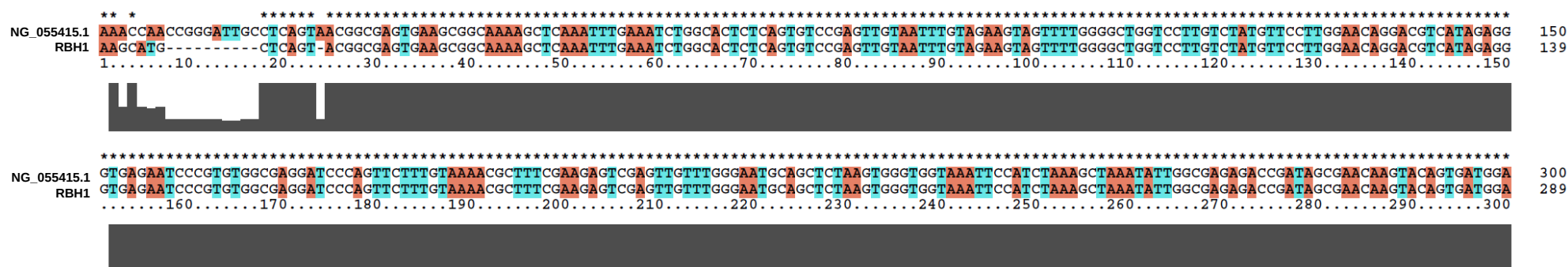
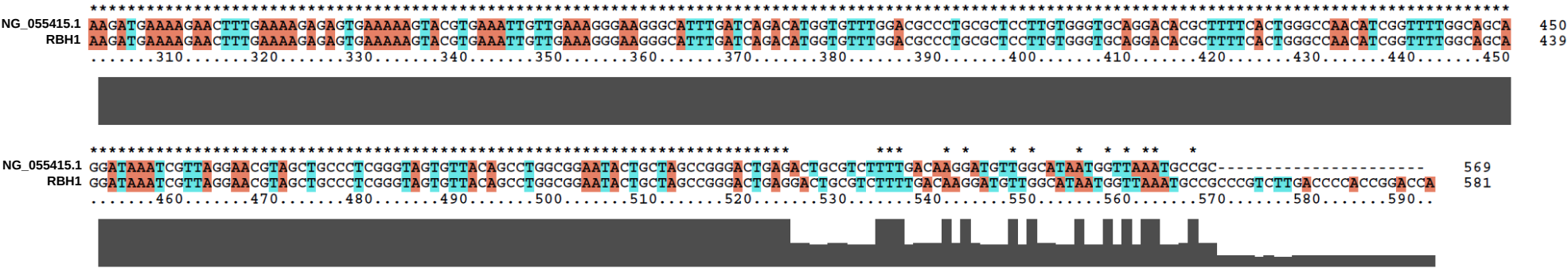
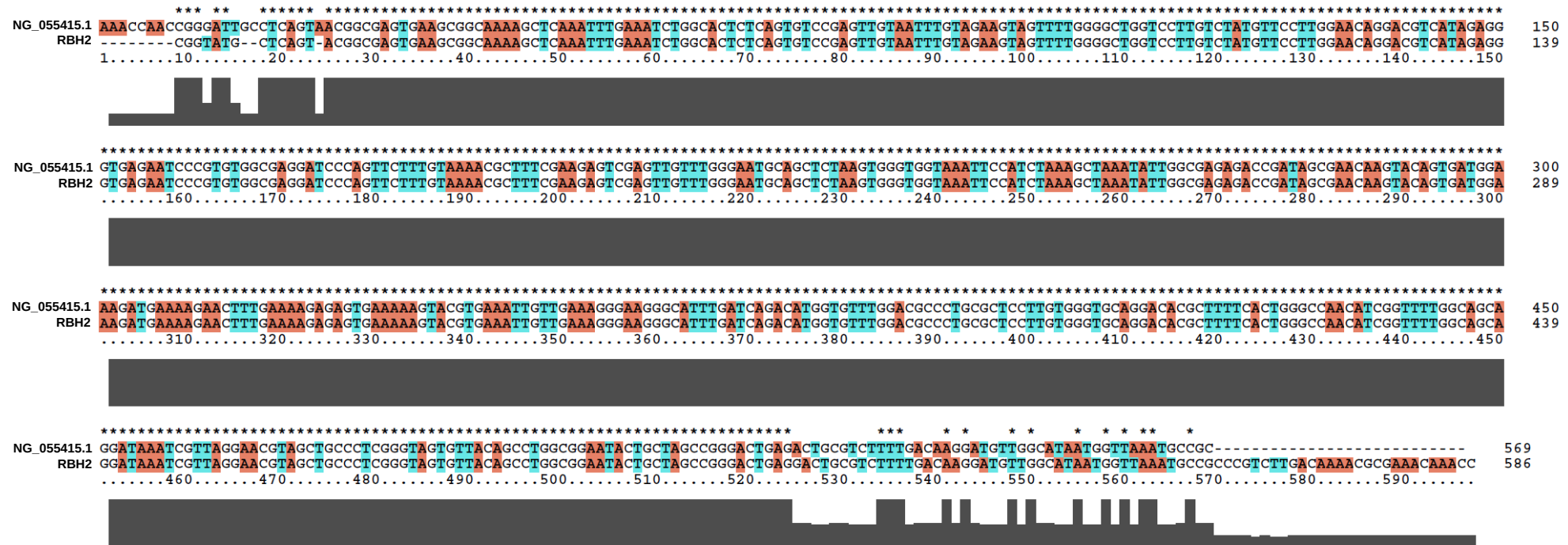


Fig. 12A - Continuação



Síteos Conservados: 554/592

Fig. 12B



Síteos Conservados: 556/597

Apêndice D: Figura 11. Alinhamento MUSCLE do domíni D1/D2 – 28s/LSU para as leveduras *Rhodotorula sp* com *Rhodotorula mucilaginosa*. As sequências obtidas das leveduras *Rhodotorula sp.* –RBR1 (A), CBR2 (B), RBR3 (C), SPR4 (D) e SPR5 (E) – foram confrondadas com a sequência da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* da espécie referenciada como uma espécie tipo (*type-strain* – número de acesso NG_055716.1). A sequência de referência foi a que apresentou maior similaridade de nucleotídeos no programa BLASTN/NCBI. As sequências foram alinhadas no programa MUSCLE® (Edgar, 2004) existente no software MEGA X (Kumar et al., 2018) e exportadas para o programa de alinhamento ClustalW 2.1. (Larkin et al., 2007). O gráfico indica o grau de conservação dos nucleotídeos (sítios conservados) das sequências alinhadas.

Fig. 13A

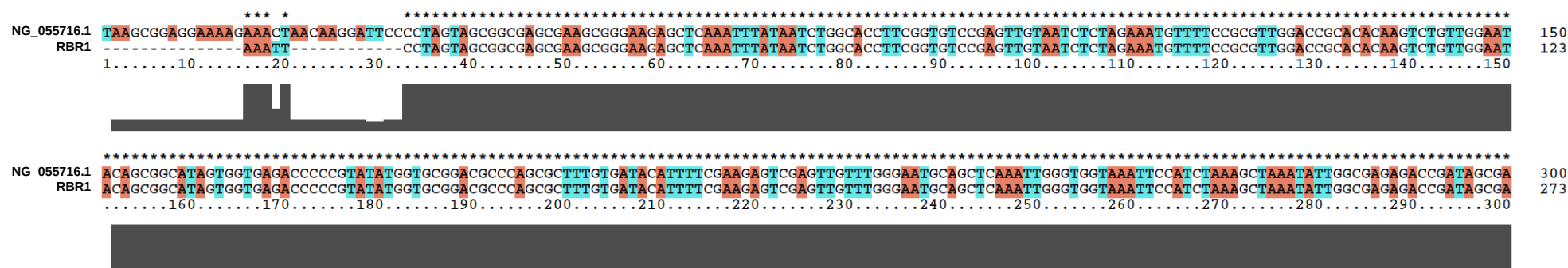
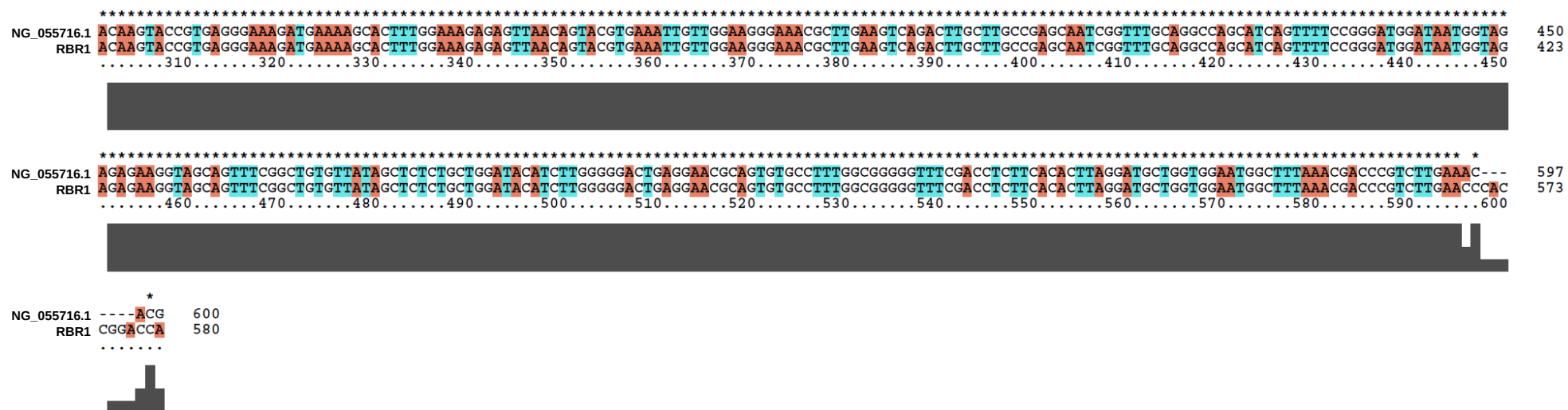
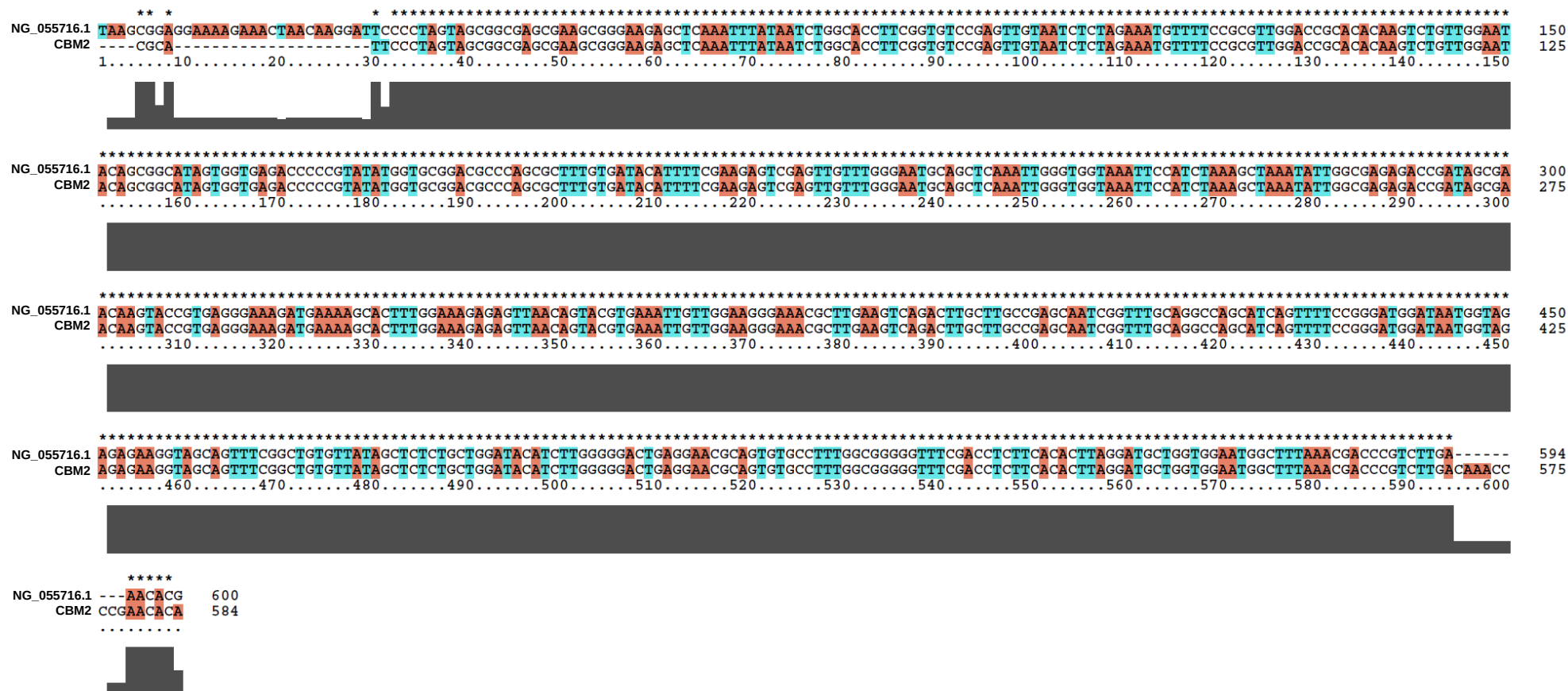


Fig. 13A -Continuação



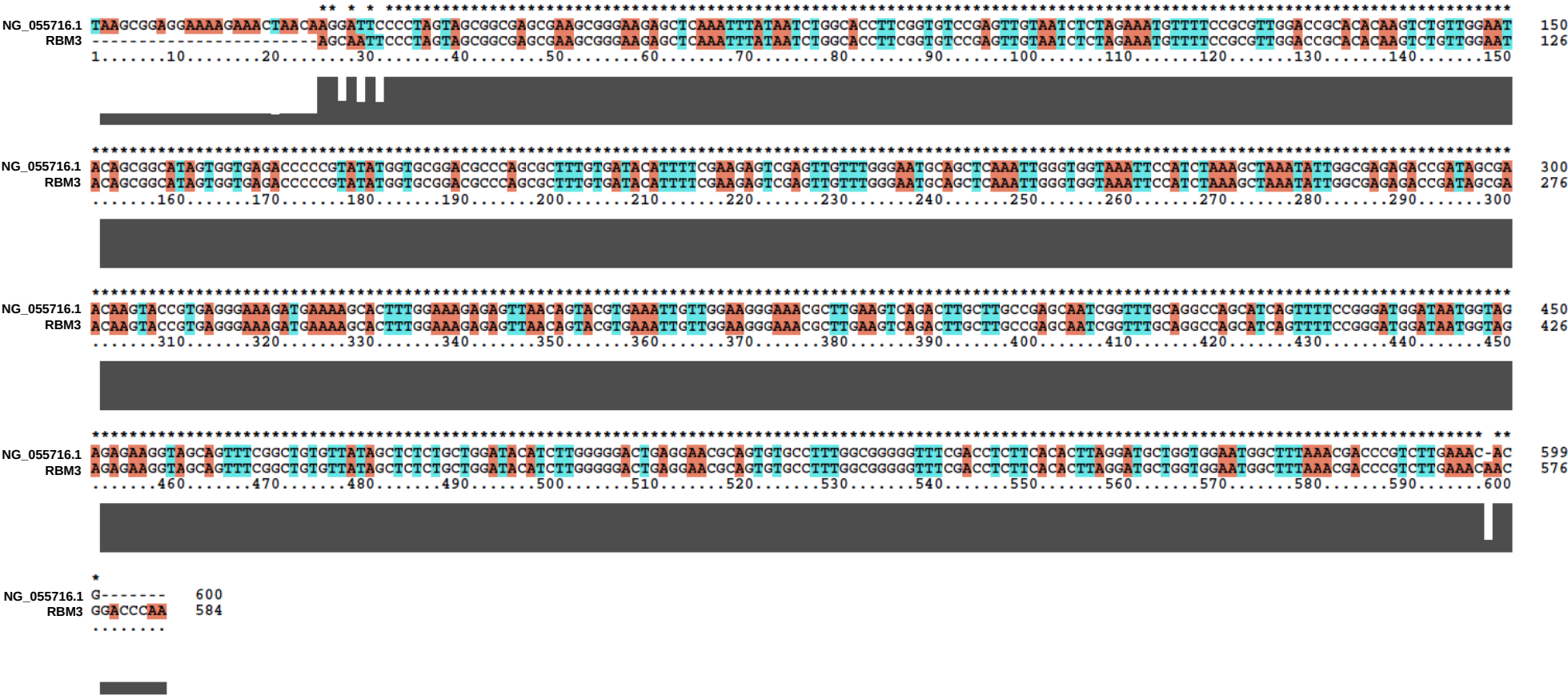
Sítios Conservados: 560/607

Fig. 13B



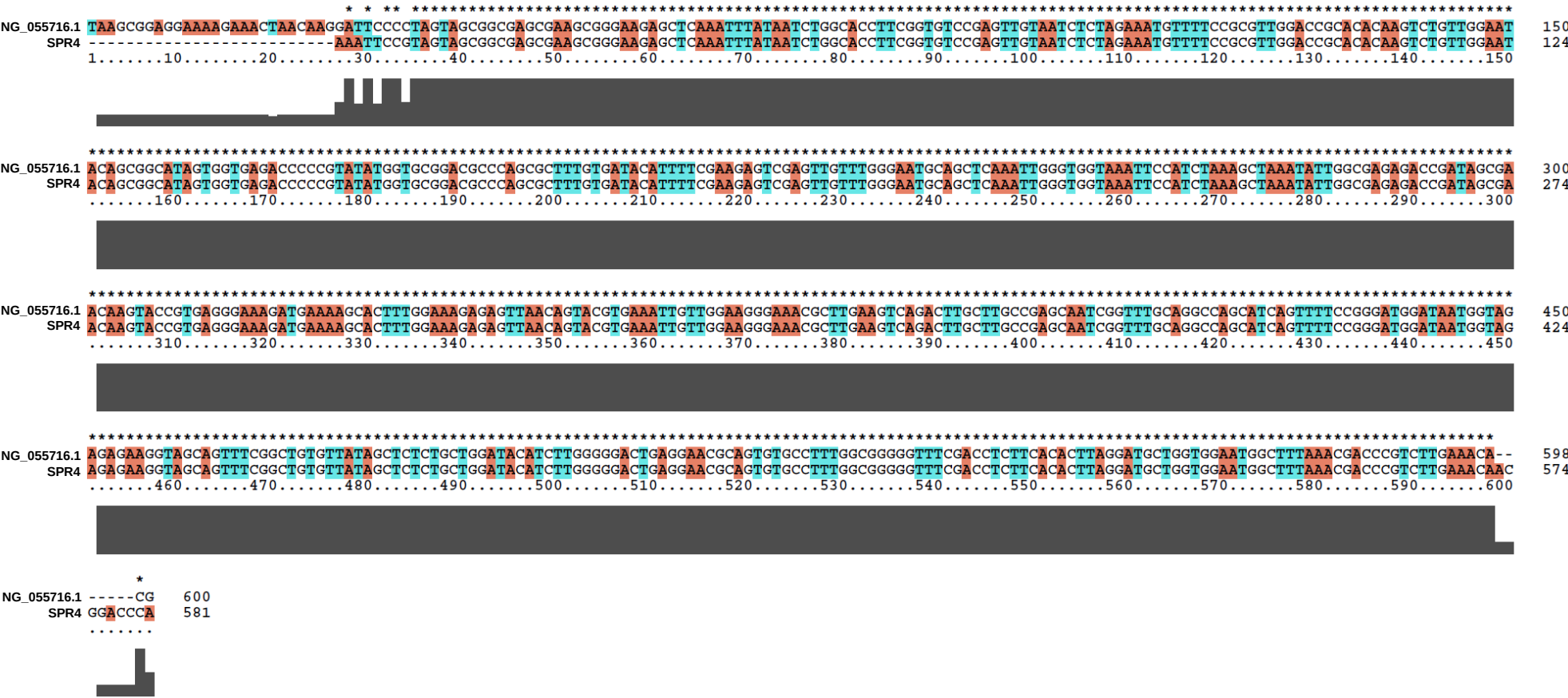
Sítios Conservados: 572/609

Fig. 13C



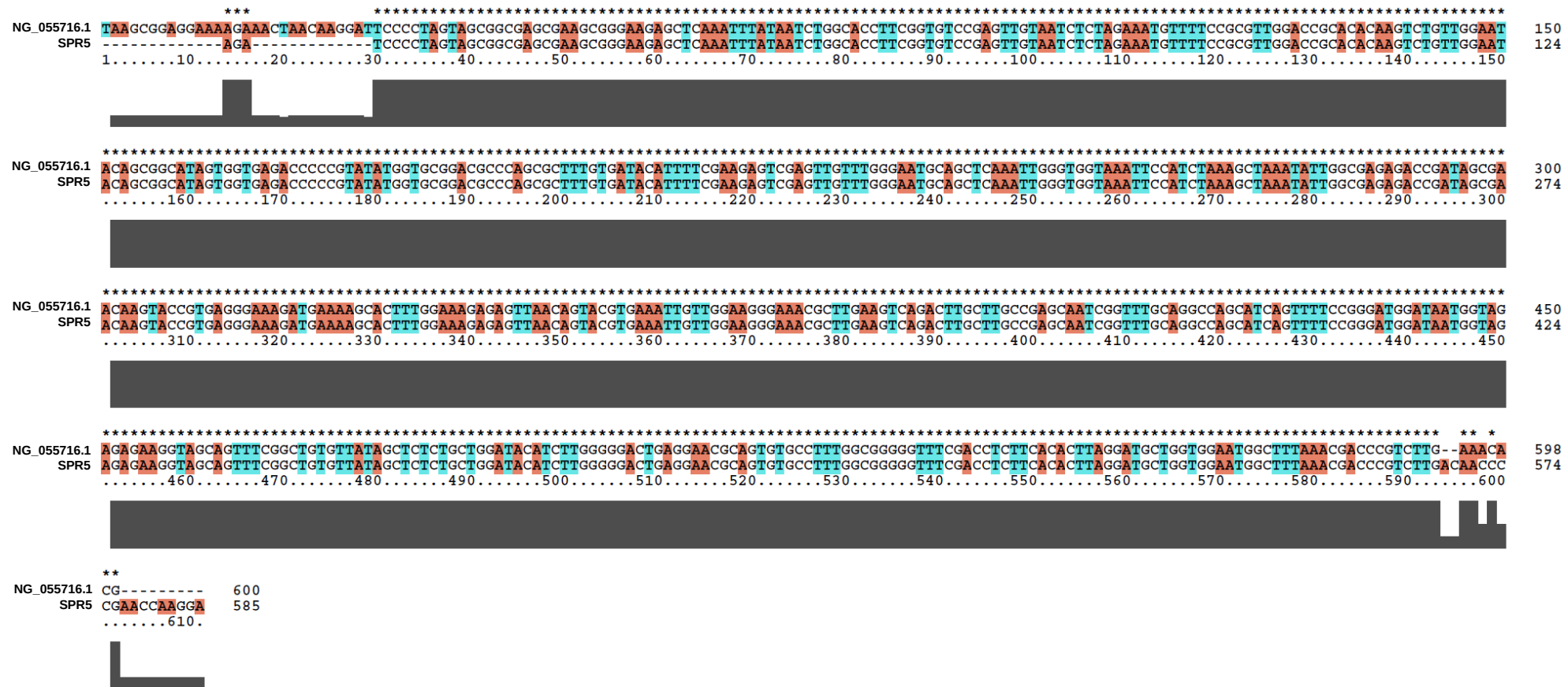
Sítios Conservados: 573/608

Fig. 13D



Síteos Conservados: 569/607

Fig. 13E



Sítos Conservados: 572/611

Apêndice D: Tabela 13. Grau de conservação dos nucleotídeos (sítios conservados) obtidos no alinhamento MUSCLE para as leveduras *Meyerozyma* sp. baseados no domínio D1/D2 da subunidade maior do 28s/LSU (*large subunit*)

Leveduras isoladas	Sítios conservados	
	Leveduras de referência (<i>type-strain</i>)	
	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	<i>Meyerozyma caribbica</i>
CBM1	574/3261	560/590
SPM2	574/3261	558/591
SPM3	570/3261	557/589
SPM4	574/3261	560/590
CBM5	574/3261	555/593
CBM6	sn	ns
CBM7	572/3261	556/591
CBM8	575/3261	556/591
SPM9	575/3261	557/592
SPM10	573/3261	556/593

- As sequências obtidas das leveduras *Meyerozyma* sp. foram confrontadas com a sequência da espécie tipo (*type-strain*): *Meyerozyma guilliermondii* (número de acesso AY939792.1), *Meyerozyma caribbica* número de acesso NG_042640.1).

- No alinhamento NBLAST, as leveduras isolas CBM1, SPM2, SPM3, SPM4, CBM7, CBM8 e SPM10 obtiveram a maior similaridade com a levedura tipo da espécie *Meyerozyma guilliermondii*.

No alinhamento NBLAST, as leveduras isolas CBM5, CBM7 e SPM9 obtiveram similaridade de 100% com a levedura da espécie tipo de *Meyerozyma caribbica*

- As sequências foram alinhadas no programa MUSCLE® (Edgar, 2004) existente no software MEGA X (Kumar et al., 2018). Os sítios conservados de nucleotídeos foram obtidos a partir do alinhamento entre as sequências.

(ns) – não sequenciada

Apêndice D: Tabela 14. Espécies de leveduras depositadas no banco de dados^a para domínio D1/D2^b

Espécie	Isolado	Número de Acesso^c	Origem^d	Local^e
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	NRRL Y-1614 ^T	NG_055419	-	-
	CEC 32A-20	KF263960	-	-
<i>Hanseniaspora lindneri</i>	NRRL Y-17531 ^T	NG_055417	-	-
	FN11S01	EF653913	Solos, planta e cogumelos	Taiwan
<i>Hanseniaspora clermontiae</i>	CBS 8821 ^T	NG_055311	-	-
	HP1	EU272040	Maça	
<i>Hanseniaspora occidentalis</i>	NRRL Y-7946 ^T	NG_055416	-	-
	N321	EU268663	Uva	
<i>Hanseniaspora vineae</i>	YFA120139	MG271803	Mão do fazendeiro	
	NRRL Y-17529 ^T	NG_055415	-	-
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	NRRL Y-2075 ^T	NG_042640	-	-
	KCTC 7832 ^T	AF257270	-	-
<i>Meyerozyma carpophila</i>	UCDFST:04-829	MH595164	Mosca de azeitona (<i>Bactrocera oleae</i>)	California
	UFMG 24C1A	HQ377291	Floresta tropical	Brasil
<i>Meyerozyma caribbica</i>	NRRL Y-27274 ^T	NG_054806	-	-
	L6A2	JQ398674	Manga cv. Ataulfo	México

^a: Domínio D1/D2 da subunidade maior (28s/LSU) do RNAr.

^b: Banco de dados – NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) – <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>

^c: Número de acesso das espécies depositadas no banco de dados.

^d: Material de origem que a levedura foi isolada.

^e: Localidade geográfica que a levedura foi isolada.

^T – Sequências de nucleotídeos equivalentes à subunidade maior (28s/LSU) do RNAr, depositadas no banco de dados e relacionadas à espécie tipo (*culture from type material*).

Tabela 14. Continuação

Espécie	Isolado	Número de Acesso ^c	Origem ^d	Local ^e
<i>Meyerozyma amylolytica</i>	NCAIM Y.02179	MF314334	-	-
<i>Candida dosseyi</i>	CBS10313 ^T	KY106419	-	-
	ATCC MYA-4359 ^T	NG_055374	-	-
<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC 22019 ^T	NG_054833	-	-
<i>Rhodotorula kratochvilovae</i>	CBS 7436 ^T	NG_042345		
	CRUB 121	AY158649	Ambientes aquáticos	Patagonia
<i>Rhodotorula glutinis</i>	CBS 20 ^T			
	AFTOL-ID 720	NG_055728	-	-
	CBS 20 ^T ML3513	AF070430	-	-
	CBS 2367 IGC 5609	AF387133	-	-
<i>Rhodotorula diobovata</i>	CBS 6085 ^T	NG_042340		
	FM1-12	MF420377	Mel	China
<i>Rhodotorula dairenensis</i>	CBS 4406 ^T	NG_057644	-	-
	VKM Y-1133	AF387146	-	-
<i>Rhodotorula araucariae</i>	CBS 6031 ^T	NG_058387	Planta	Chile
		AF070427		
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	DMKU-SPS4-2	LC423489	Turfa na floresta de pântano de turfa	Tailândia
	CBS 316 ^T	NG_055716	-	-
	IM-2	EF490690	-	-

^a: Domínio D1/D2 da subunidade maior (28s/LSU) do RNAr.

^b: Banco de dados – NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) – <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>

^c: Número de acesso das espécies depositadas no banco de dados.

^d: Material de origem que a levedura foi isolada.

^e: Localidade geográfica que a levedura foi isolada.

^T – Sequências de nucleotídeos equivalentes à subunidade maior (28s/LSU) do RNAr, depositadas no banco de dados e relacionadas à espécie tipo (*culture from type material*).

Apêndice D: Figura 12. Dendograma das leveduras isoladas do colmo de cana-de-açúcar a partir domínio D1/D2 da subunidade maior do 28s/LSU (large subunit). As sequências obtidas das leveduras isoladas foram adicionadas ao conjunto de sequências obtido no banco de dados e alinhadas no programa MUSCLE® (Edgar, 2004) existente no software MEGA X (Kumar et al. 2018), onde a análise evolutiva foi realizada. A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining (Saitou e Nei, 1987) com bootstrap de 2000 réplicas (Felsenstein, 1985). As ramificações correspondentes às partições reproduzidas em menos de 50% de replicação de autoinicialização são recolhidas. A porcentagem de árvores replicadas nas quais os táxons associados se agruparam no teste de autoinicialização (2000 réplicas) são mostrados próximos aos ramos (Felsenstein, 1985). As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método distance p (Nei e Kumar, 2000) e estão nas unidades do número de diferenças de base por local. Esta análise envolveu 52 sequências nucleotídicas. As posições do códon incluídas foram 1^a + 2^a + 3^a + não codificação. Todas as posições que contêm lacunas e dados ausentes foram eliminadas (opção de exclusão completa). Havia um total de 343 posições no conjunto de dados final. As leveduras isoladas foram representadas pelo código da coleção: *Candida* sp. (SPC1, RBC2 e RBC3), *Hanseniospora* sp. (RBH1e RBH2); *Meyerozyma* sp. (CBM1, SPM2, SPM3, SPM4, CBM5, CBM6, CBM7, CBM8, SPM9 e SPM10); *Rhodotorula* sp. (RBR1, CBR2, RBR3, SPR4 e RBR5). Terminais marcados com (†) representam sequências de nucleotídeos equivalentes à região 28s/LSU, depositadas no banco de dados (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>) e relacionadas à espécie tipo (culture from type material).

(Cont. Fig 15)



0,07