



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE GURUPI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

TAÍS ARAGÃO ISHIZAWA

**MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS E ASSOCIADOS DE
MELANCIA E APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA**

**Gurupi - TO
2017**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE GURUPI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

TAÍS ARAGÃO ISHIZAWA

**MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS E ASSOCIADOS DE
MELANCIA E APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Raimundo Wagner de Souza Aguiar

Co-orientadora: Dr^a. Léia Cecília de Lima Fávaro

**Gurupi - TO
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

179m Ishizawa, Taís Aragão.
MICROORGANISMOS ENDOFÍTICOS E ASSOCIADOS DE
MELANCIA E APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA. / Taís Aragão
Ishizawa. – Gurupi, TO, 2017.
111 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do
Tocantins – Câmpus Universitário de Gurupi - Curso de Pós-
Graduação (Mestrado) em Biotecnologia, 2017.

Orientador: Raimundo Wagner de Souza Aguiar

Coorientador: Léia Cecília de Lima Fávaro

1. Bactérias. 2. Leveduras. 3. Citrullus lanatus. 4. Endófitos. I.
Título

CDD 660.6

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de
qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que
citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime
estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da
UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

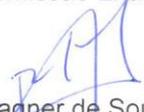
Rua Badejós, Chácaras 69 e 72 - CEP: 77402-970 - Caixa Postal 66 | Gurupi/TO
(63) 3311-3549 | www.uft.edu.br/biotecnologia | ppgbiotec@uft.edu.br

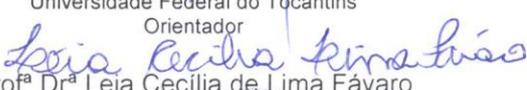


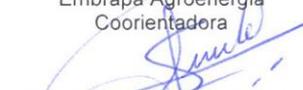
Ata de Defesa nº 33/2017

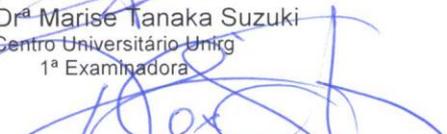
ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE TAÍS ARAGÃO ISHIZAWA DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS.

Aos 30 dias do mês de junho do ano de 2017, às 14 horas, na sala 15, edifício BALA II, campus de Gurupi, da Universidade Federal do Tocantins, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Orientador Dr. RAIMUNDO WAGNER DE SOUZA AGUIAR da Universidade Federal do Tocantins, Profª Drª LÉIA CECÍLIA DE LIMA FÁVARO da Embrapa Agroenergia, Profª. Drª. MARISE TANAKA SUZUKI do Centro Universitário Unirg, Prof Dr ALEX SANDER RODRIGUES CANGUSSU da Universidade Federal do Tocantins, Prof Dr GIL RODRIGUES DOS SANTOS da Universidade Federal do Tocantins e Prof Dr FABRICIO SOUZA CAMPOS da Universidade de Brasília, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de TAÍS ARAGÃO ISHIZAWA, intitulada "**Microrganismos endofíticos e associados de melancia e aplicação biotecnológica**". Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo parecer favorável à aprovação, com as devidas correções apontadas pela banca, habilitando-a ao título de Mestre em Biotecnologia. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

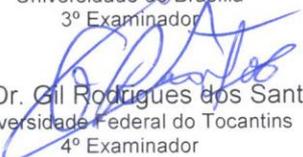

Prof. Dr. Raimundo Wagner de Souza Aguiar
Universidade Federal do Tocantins
Orientador


Profª Drª Leia Cecília de Lima Fávaro
Embrapa Agroenergia
Coorientadora


Profª Drª Marise Tanaka Suzuki
Centro Universitário Unirg
1ª Examinadora


Prof. Dr. Alex Sander Rodrigues Cangussu
Universidade Federal do Tocantins
2º Examinador


Prof. Dr. Fabricio Souza Campos
Universidade de Brasília
3º Examinador


Prof. Dr. Gil Rodrigues dos Santos
Universidade Federal do Tocantins
4º Examinador

Gurupi, 30 de junho de 2017.


Prof. Dr. Gessiel Newton Scheidt
Coordenador do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia

Dedico este trabalho

A minha mãe, Elza, que me fortaleceu a todo instante.

A minha irmã Aline, que me incentivou constantemente.

A minha sobrinha, Maria Alice, minha maior motivação.

Ao meu pai, Luís, que me apoiou em toda a caminhada.

A minha avó Zulmira, que sempre acreditou em mim.

DEDICATÓRIA E AGRADECIMENTO

Agradeço, primeiramente, a Deus por ter proporcionado e abençoado cada momento desta caminhada, por todo amor, força e fé.

Agradeço a minha mãe, Elza, e irmã, Aline, pelo amor incondicional e pelo apoio e força imensurável. A minha sobrinha, Maria Alice, pelo amor mais puro e ao meu pai, Luís, pelo amor e apoio. Aos meus primos Maria Rita e Estêvão por todo o auxílio e aos meus familiares por acreditarem em mim.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e a CAPES pela bolsa concedida. Ao professor e orientador Dr. Raimundo por todo ensinamento, experiência e oportunidade proporcionada. A pesquisadora e co-orientadora, Dr^a. Léia, por ter me acolhido na Embrapa Agroenergia, pela paciência, aprendizado e por todo esforço para a realização das atividades. Ao professor Dr. Alex Sander e Dr. Gil por participar da banca e por toda prestatividade. A Dr^a. Marise e Dr. Fabrício, pela participação na banca, pela contribuição na realização das atividades e aprendizado.

Agradeço a Embrapa Agroenergia pela parceria construída, ao pessoal do Laboratório de Genética e Biotecnologia - LGB por terem me aceitado e aos analistas, em especial a Rosana, por toda assistência. Ao grupo de pesquisa da Dr^a. Léia pela paciência, compreensão, cooperação e troca de conhecimento.

Agradeço a família Gama, em especial seu Ribamar, Walquiria e Jacqueline por terem me acolhido em Brasília, por todo amparo, paciência e carinho. A Fernanda, Jéssica, Gleiciane e Tallyta pelos momentos compartilhados, pela troca de conhecimentos e pela amizade construída. A Dr^a. Ana Paula por todo o apoio e ao grupo Vinho Novo pelos momentos com Deus.

Agradeço aos colegas do laboratório MIP pela convivência e colaboração, em especial ao Suetônio, Bruno e Giselly por toda a ajuda. Aos professores Dr. Clóvis e Dr^a. Susana e a técnica Álida pelo empréstimo dos laboratórios e ao professor Dr. Ezequiel, Dr. Augustus, Dr^a Lina e a técnica Dalmácia pela ajuda e aprendizado.

Agradeço as amigas Ana Carolina, Keile e Keila pelo companheirismo, apoio e momentos juntas, em especial a Carol por ter me acolhido na reta final. A amiga Mayra por compartilharmos de mais esta etapa e a todos os amigos que me acompanharam e apoiaram nesta caminhada.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcuta

ISHIZAWA, Taís Aragão. **Microrganismos endofíticos e associados de melancia e aplicação biotecnológica.** 2017. 111f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, 2017.

RESUMO

Os microrganismos endofíticos vêm sendo estudados na busca de novas espécies e pela sua importância nas aplicações biotecnológicas. Podem ser isolados de sementes, raízes, folhas e em frutos de diversas espécies de plantas. Além disso, pouco se sabe a respeito desses microrganismos associados as folhas e frutos da melancia. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi isolar e identificar bactérias e leveduras endofíticas e associadas às folhas e frutos de melancia, assim como avaliar o potencial biotecnológico dos isolados de leveduras. As amostras foram obtidas de frutos oriundos de Brasília-DF e de plantas de Formoso do Araguaia-TO. Para o isolamento dos microrganismos foram adotados diferentes procedimentos para folhas: fragmentação e trituração, testando-se quatro condições de desinfestação superficial e para os frutos: trituração, enriquecimento e filtração em membrana. A identificação e caracterização molecular foi realizada pela técnica de PCR *colony* para bactérias e pela extração do DNA genômico de leveduras e bactérias. O DNA dos isolados foi amplificado utilizando oligonucleotídeos P027F e R1357 para bactérias, e NL1 e NL4 para leveduras. Para os isolados de leveduras foram realizados os testes de antagonismo contra oito fungos fitopatogênicos e a capacidade de produzir ácido indolacético (AIA). De acordo com resultados, foram obtidos 380 isolados de bactérias e 240 leveduras endofíticas e associadas, com maior número de isolados no tecido foliar, sendo identificadas 71 bactérias e 92 leveduras. Foram identificados 12 gêneros de bactérias, com o gênero *Pantoea* sp. isolado em maior quantidade. Para os isolados de leveduras, foram identificados 5 gêneros, com destaque para a espécie *Sporidiobolus pararoseus*, obtida de folhas e frutos de melancia. Os isolados de leveduras associadas TAIL 04 (99% *Saccharomyces cerevisiae*) e TAIL 63 (99% *Pseudozyma antarctica*) apresentaram atividade de antagonismo para os fungos *Sclerotinia sclerotium*, *Alternaria* sp., *Curvularia lunata*, *Rhizoctonia solana* e *Pyricularia oryzae*. Este também foi inibido pelos isolados TAIL 95 (99% *Hannaella sinensis*) e TAIL 66 (100% *Sporidiobolus pararoseus*) e apresentou maior inibição de 32,82% com o isolado *S. cerevisiae* (TAIL 04). Simultaneamente, os isolados *S. cerevisiae* (TAIL 04) e *P. antarctica* (TAIL 04) mostraram capacidade em produzir ácido indolacético (AIA) nas concentrações de 21,14 µg/mL e 15,79 µg/mL, respectivamente, em após 7 dias de incubação. Conclui-se que folhas e frutos de melancia possuem importantes bactérias e leveduras endofíticas e associadas de interesse biotecnológico, como promotores de crescimento da planta e como antagonistas, possibilitando o seu uso no desenvolvimento de bioprodutos.

Palavras-Chave: bactérias; leveduras; *Citrullus lanatus*; endófitos

ISHIZAWA, Taís Aragão. **Watermelon associated Endophytic microorganisms and biotechnological applications.** 2017. 111f. Dissertation (Master in Biotechnology) - Federal University of Tocantins, Gurupi, 2017.

ABSTRACT

Endophytic microorganisms have been studied in the identification of new species and for their importance in biotechnological applications. Can be isolated them from seeds, roots, leaves and in fruits of several plant species. Besides, the relation between these microorganisms and watermelon leaves and fruits is far from being well known. Therefore, the main of this work was to identify both endophytic and associated bacteria and yeasts to leaves and fruits of watermelon, as well as evaluate biotechnological potential applications of yeast isolate. The samples were obtained of fruits from Brasília-DF and plants from Formoso do Araguaia-TO. For the isolation of the microorganisms were used different procedures for the leaves: fragmentation and crushing, by testing four surface disinfection conditions and for the fruits: crushing, enriching and filtration in membrane. Molecular identification and characterization was realized by the colony PCR technique for bacteria and the extraction of genomic DNA from yeasts and bacteria. The DNAs of the isolates was amplified using oligonucleotides P027F and R1357 for bacteria and NL1 and NL4 for yeast. For the yeasts isolate tests of antagonisms for phytopathogenic and producers of indoleacetic acid (AIA) were carried out. A total of 380 bacteria and 243 endophytic and associated yeasts were isolated, obtaining a higher number of isolates from the watermelon leaf tissue and 71 bacteria and 92 yeasts were identified. Twelve genus of bacterias were identified, with the gener *Pantoea* sp. isolated in larger quantity. For yeasts isolated were identified five genus, with featured for the specie *Sporidiobolus pararoseus* obtained of leaves and fruits of watermelon. Associated yeasts isolates TAIL 04 (99% *Saccharomyces cerevisiae*) and TAIL 63 (99% *Pseudozyma Antarctica*) showed antagonistic activity for the fungi *Sclerotinia sclerotium*, *Alternaria* sp., *Curvularia lunata*, *Rhizoctonia* sp., *Didymella* sp. and *Pyricularia oryzae*. This also was inhibited by TAIL 95 (99% *Hannaella sinensis*) and TAIL 66 (100% *Sporidiobolus pararoseus*) isolated and showed greater inhibition of 32,82% with *S. cerevisiae* (TAIL 04). Simultaneously, *S. cerevisiae* (TAIL 04) and *P. Antarctica* (TAIL 63) showed capacity to producer indoleacetic acid (IAA) in concentrations of 21,14 µg/mL and 15,79 µg/mL, respectively, in 7 days of incubation. It is concluded that watermelon leaves and fruits have important endophytes and associated bacterias and yeasts of biotechnological interest as growth promoters and antagonists, making possible their use in the development of bioproducts.

Keywords: bacterias; yeasts; *Citrullus lanatus*; endophytes

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Indicativos econômicos e produtivos da melancia no Estado do Tocantins no ano de 2015.	20
Tabela 2 - Bioprodutos comercializados a base de bactérias e leveduras e suas empresas produtoras.	31
Tabela 3 - Condições de esterilização testadas para a desinfestação da superfície da folha de melancia (<i>Citrullus lanatus</i>).	37
Tabela 4 - Número de isolados de bactérias e leveduras obtidos de diferentes procedimentos aplicados para folhas e frutos de melancia provenientes do comércio de Brasília – DF e de lavouras comerciais de Formoso do Araguaia – TO.....	54
Tabela 5 - Percentual de frequência de isolamento de leveduras e bactérias endofíticas de folhas de melancia ao final de sete dias de incubação.	58
Tabela 6 - Identificação das sequências de isolados de bactérias endofíticas e associadas a folhas e frutos de melancia por meio da região 16S do DNA ribossômico.	60
Tabela 7 - Identificação das sequências de isolados de leveduras endofíticas e associadas a folhas e frutos de melancia por meio da região 26S (domínio D1/D2) do DNA ribossômico.....	73
Tabela 8 - Percentual de inibição do crescimento radial de fungos fitopatogênicos pelos isolados de leveduras associadas obtidas de folhas e frutos de melancia.	88
Tabela 9 - Concentração de AIA ($\mu\text{g/mL}$) produzido pelas leveduras associadas obtidas de frutos e folhas de melancia após o período de 7 dias de incubação a temperatura de 30 °C sob agitação em shaker a 150 rpm.	97

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Fruto e folha da melancia (cv. Crimson Sweet). Seta preta indica a polpa do fruto avermelhada e seta branca o formato da folha. Fonte: Sativa (2017)..... 19
- Figura 2** - Representação da seção transversal esquemática ampliada de uma folha de planta de soja. Microrganismos, particularmente bactérias (mostradas) e fungos (não mostrados), podem colonizar a superfície da folha e o apoplasto (espaço intercelular que envolve as células vegetais). Fonte: Vorholt (2012).22
- Figura 3** - Propriedades benéficas dos endofíticos. Fonte: Hardoim et al. (2015, p.301).28
- Figura 4** - Modos de ação utilizados pelos agentes de biocontrole, na interação com o patógeno e o fruto-hospedeiro. ERO: espécies reativas de oxigênio. Fonte: Spadaro; Droby (2015).32
- Figura 5** - Agregado gênico do rDNA em bactérias. 16S, 23S e 5S: regiões do DNA ribossomal; ITS: *Internal Transcribed Spacer* (Espaçadores Transcritos Internos). Fonte: Martins et al. (2014).35
- Figura 6** - Agregado gênico do rDNA em fungos e leveduras. 18S, 5.8S, 26S e 5S: regiões do DNA ribossomal; ITS: *Internal Transcribed Spacer* (Espaçadores Transcritos Internos); Região D1/D2: subunidade grande do RNA ribossomal. Fonte: Adaptado de Yaazh Xenomics (2017).35
- Figura 7** - Procedimentos realizados na desinfestação da superfície da folha de melancia, sendo a sequência de reagentes: etanol 70% (pote 1), hipoclorito (pote 2), etanol 70% (pote 3) e água destilada autoclavada (pote 4, 5 e 6).38
- Figura 8** - Procedimento para obtenção de microrganismos endofíticos de fragmentos de folhas de melancia nos meios **(a)** PDA, **(b)** YPDA e **(c)** TSA 5%.39
- Figura 9** - Macerado de folhas de melancia com tampão PBS e pérolas de vidro obitido para o isolamento por trituração.40
- Figura 10** - Fruto de melancia obtido de Brasília – DF processado para isolamento de microrganismos endofíticos a partir da polpa retirada do fruto descascado. Procedimento realizado em capela de fluxo laminar.41
- Figura 11** - Procedimentos realizados no isolamento por filtração em membrana: **(a)** descasque e retirada da polpa; **(b)** filtração do suco obtido; **(c)** filtração do suco em membrana; **(d)** placas inoculadas com as membranas.44
- Figura 12** - Etapas do isolamento com fruto passado: **(a)** fruto descascado; **(b)** filtração do suco em papel filtro; **(c)** filtração do suco em membrana; **(d)** inoculação da membrana em tampão PBS.46
- Figura 13** - Esquema representativo da análise de sequenciamento e análise filogenética dos isolados de bactérias e leveduras.51
- Figura 14** - Eficiência das condições de desinfestação superficial comprovada pelo inóculo da água de lavagem **(a)** placas com crescimento de microrganismo; **(b)** redução do número de colônias nos tempos de desinfestação.56

Figura 15 - Fragmentos de folha de melancia com crescimento microbiano nos meios (a) PDA, (b) YPDA e (c) TSA 5%.....	57
Figura 16 - (a) Diversidade de colônias de bactérias em placa TSA 5% de isolamento; (b) Produtos de amplificação da região 16S do DNA ribossômico de bactérias endofíticas e associadas obtidas de folhas e frutos de melancia.....	59
Figura 17 - Representação em percentual dos filos isolados de bactérias endofíticas e associadas de folhas e frutos de melancia.	64
Figura 18 - Representação da filogenia obtida a partir do alinhamento de 34 seqüências da região ribossomal 16S de isolados de bactérias de melancia.	65
Figura 19 - Percentual de espécies de bactérias isoladas dos procedimentos e tecidos: fragmento (folha), macerado (folha), membrana (suco) e enriquecimento (suco).	68
Figura 20 - Produtos de amplificação da região 26S (domínio D1/D2) do DNA ribossômico de leveduras endofíticas e associadas obtidas de fohas e frutos de melancia.....	72
Figura 21 - Árvore filogenética mostrando relação entre as seqüências de genes 26S (D1/D2) de leveduras endofíticas e associadas de folhas e frutos de melancia.	81
Figura 22 - Percentual de espécies de leveduras isoladas dos procedimentos e tecidos: fragmento (folha), macerado (folha), membrana (suco), enriquecimento (suco) e concentrado (suco).....	83
Figura 23 - Esquema representativo de espécies de (a) bactérias e (b) leveduras obtidas da superfície interna e externa de folhas de melancia.	85
Figura 24 - Percentual de inibição do crescimento radial dos fungos (a) <i>S. sclerotiorum</i> , (b) <i>Didymella</i> sp., (c) <i>Alternaria</i> sp., (d) <i>C. lunata</i> e (e) <i>P. oryzae</i> pelos isolados de leveduras <i>S. cerevisiae</i> (TAIL 04), <i>P. antarctica</i> (TAIL 63), <i>S. pararoseus</i> (TAIL 66) e <i>H. sinensis</i> (TAIL 95).....	87
Figura 25 - Inibição do crescimento radial dos fungos (a) <i>P. oyizae</i> , (b) <i>Alternaria</i> sp., (c) <i>C. lunata</i> , (d) <i>S. sclerotirum</i> e (e) <i>Didymella</i> sp. pelo isolado <i>P. antarctica</i> (TAIL 63). A seta preta indica o crescimento de Raio 2 (R2) e a seta banca o crescimento do Raio 1 (R1).....	90
Figura 26 - Inibição do crescimento radial dos fungos (a) <i>P. oryzae</i> , (b) <i>C. lunata</i> e (c) <i>S. sclerotiorum</i> pelo isolado <i>S. cerevisiae</i> (TAIL 04). A seta preta indica o crescimento de R2 e a seta branca o crescimento do R1.	91
Figura 27 - Inibição do crescimento radial do fungo <i>P. oryzae</i> com o isolado (a) <i>S. pararoseus</i> (TAIL 66) e (c) <i>H. sinensis</i> (TAIL 95). A seta vermelha indica o crescimento de R2 e a seta preta o crescimento do R1.....	93
Figura 28 - Inibição do crescimento radial do fungo <i>R. solani</i> com o isolado <i>P. antarctica</i> (TAIL 63).....	94
Figura 29 - Crescimento micelial dos fungos (a) <i>Didymella</i> sp., (b) <i>Alternaria</i> sp. e (c) <i>C. lunata</i> com os isolados <i>S. cerevisiae</i> (TAIL 04), <i>S. pararoseus</i> (TAIL 66) e <i>H. sinensis</i> (TAIL 95) comparado às placas controle.....	95

Figura 30 - Formação do halo entre o isolado de levedura *Pseudozyma antarctica* (TAIL 63) e os fungos **(a)** *S. sclerotiorum* e **(b)** *Didymella* após 10 dias de incubação. A seta branca indica o halo formado.96

Figura 31 - Reação colorimétrica do sobrenadante dos isolados de leveduras associadas obtidas de frutos e folhas de melancia com o reagente Salkowski após incubação de 30 minutos. A coloração rósea indica a produção de AIA.97

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	A cultura da melancia	18
2.2	Microbioma das plantas.....	21
2.2.1	Microrganismos endofíticos e suas propriedades.....	25
2.2.1.1	Aspectos gerais	25
2.2.1.2	Isolamento de microrganismos endofíticos.....	26
2.2.1.3	Propriedades benéficas dos endófitos.....	27
2.2.2	Caracterização molecular de microrganismos endofíticos	33
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.1	Coleta das amostras de frutos e folhas de melancia	36
3.2	Procedimentos de isolamento de microrganismos endofíticos da melancia	36
3.2.1	Folhas.....	37
3.2.1.1	Isolamento por fragmentação.....	37
3.2.1.2	Isolamento por trituração	39
3.2.2	Frutos	41
3.2.2.1	Fruto maduro.....	41
3.2.2.1.1	Isolamento a partir do concentrado de melancia.....	42
3.2.2.1.2	Isolamento da polpa macerada e enriquecida	42
3.2.2.1.3	Isolamento por filtração em membrana	43
3.2.2.2	Fruto em estágio avançado de maturação	44
3.2.2.2.1	Isolamentos	44
3.3	Preservação de bactérias e leveduras	47
3.4	Caracterização molecular de bactérias e leveduras associadas a frutos e folhas de melancia.....	48
3.4.1	Extração de ácidos nucleicos	48
3.4.2	Reação em Cadeia da Polimerase – PCR	49
3.4.3	Purificação de produtos de PCR e sequenciamento	50
3.4.4	Análise das sequências e análise filogenética	50
3.5	Teste de antagonismo contra fungos fitopatogênicos	52
3.6	Produção de ácido indolacético por isolados de leveduras endofíticas e associadas	52
3.7	Análise estatística.....	53
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1	Isolamento de bactérias e leveduras endofíticas e associadas de folhas e frutos de melancia	54
4.1.1	Isolamento por fragmentação de folhas de melancia	55
4.1.1.2	Frequência de isolamento de endofíticos	56
4.2	Identificação dos microrganismos de folhas e frutos de melancia	58
4.2.1	Bactérias	58
4.2.1.1	Distribuição de isolados de bactérias em folhas e frutos de melancia.....	67
4.2.2	Leveduras.....	72
4.2.2.1	Distribuição de isolados de leveduras em folhas e frutos de melancia.....	82

4.2.3	Espécies endofíticas e associadas de folhas de melancia	85
4.3	Teste de antagonismo de isolados de leveduras contra fungos fitopatogênicos.....	86
4.4	Produção de ácido indolacético por isolados de leveduras	96
5	CONCLUSÕES	100
6	REFERÊNCIAS.....	101

1 INTRODUÇÃO

A melancia (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai) pertence à família das cucurbitáceas, de cultivo anual e é considerada uma planta de clima tropical. Seu fruto apresenta características e compostos peculiares, que desempenham um importante papel na alimentação humana, e sua semente também é consumida em alguns países, por sua composição nutricional (DIAS; REZENDE, 2010). A cultura da melancia possui grande importância econômica para os países em desenvolvimento e no Brasil vem sendo cultivada em quase todo o país. Entre as principais regiões produtoras estão o Nordeste, Sudeste e Norte, e por suas características o estado do Tocantins tem se destacado como forte produtor na região norte (IBGE, 2013).

Os tecidos vegetais, como folhas, caules e raízes hospedam microrganismos capazes de desenvolver funções benéficas para a planta, vivendo dentro do tecido interno (endofíticos) e sobre a superfície (epifíticos). Esses microrganismos têm sido estudados para compreender seu papel na interação com as plantas e têm ganhado importância também por suas aplicações biotecnológicas, tais como fitorremediação e biocontrole de fitopatógenos (LINDOW; BRANDL, 2003; TURNER et al., 2013; KUKLA et al., 2014).

Os microrganismos endofíticos (principalmente bactérias e fungos) podem desempenhar funções importantes para o desenvolvimento da planta, como fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato, produção de sideróforos, fitohormônios como a auxina e de compostos orgânicos voláteis que promovem o seu crescimento (HARDOIM et al., 2015). Além disso, podem estar envolvidos na proteção contra patógenos, pragas e insetos, por meio da competição por espaço e nutrientes e pela produção de compostos antimicrobianos (MARTINS et al., 2014). Os estudos sobre endófitos também têm aumentado, especialmente por serem considerados uma rica fonte de novos compostos bioativos, como anticancerígenos e antioxidantes, importantes fármacos e produtos de interesse biotecnológico como enzimas, compostos químicos e voláteis e carotenoides (VALDUGA et al., 2014; HARDOIM et al., 2015).

Microrganismos endofíticos têm sido isolados de diversas plantas cultivadas como algodão e mandioca (TEIXEIRA et al., 2007; MONNERAT et al., 2010), soja

(BAI et al., 2002) e milho (MCINROY; KLOEPPER, 1995). Neste aspecto, a bioprospecção do microbioma cultivável associada às plantas pode levar à descoberta de novos compostos biotecnológicos, consistindo uma alternativa para inibição e até mesmo na indução de resistência das plantas contra fitopatógenos e herbívoros. De acordo com a literatura, algumas proteínas de defesa são acumuladas em altos níveis nos tecidos vegetais colonizados pelos microrganismos endofíticos e possuem atividade inibidora direta sobre o organismo-praga, podendo influenciar diretamente seu desenvolvimento (LIPKE et al., 1954; RYAN, 1990; KOIWA et al., 1997; PANNETIER et al., 1997; LAWRENCE; KOUNDAL, 2002).

Poucos estudos são encontrados na literatura sobre microrganismos associados às plantas de melancia e que envolvem principalmente o estudo da comunidade bacteriana cultivável. Bactérias endofíticas foram isoladas de folhas, caule e raízes de melancia (*Citrullus lanatus* Thunb.) (XIA et al., 2015), de frutos de melancia da variedade 'cv. Early moonbeam', avaliando sua atividade antifúngica e antibacteriana, e de sementes de melancia das variedades "Early Canada" e "Crimson sweet" (GLASSNER et al., 2015), analisando a produção de compostos que promovem o crescimento vegetal (KHALAF; RAIZADA, 2016).

Considerando a importância econômica da melancia no estado do Tocantins, o conhecimento limitado do seu microbioma endofítica e as propriedades significativas desenvolvidas pelos endófitos, o objetivo deste trabalho foi (a) isolar e identificar bactérias e leveduras endofíticas e associadas de folhas e frutos de melancia e, (b) avaliar a aplicação biotecnológica das leveduras isoladas no biocontrole de fungos fitopatogênicos e como promotores de crescimento vegetal.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A cultura da melancia

A origem da melancia é baseada em evidências encontradas no Vale do rio Nilo há pelo menos 2000 a.C.. Outra teoria demonstra que a melancia foi derivada da espécie *Citrullus colocynthis*, nativa da África que foi encontrada nos primeiros sítios arqueológicos, ou ainda, que pode ter sido domesticada, nos tempos pré-históricos, por formas selvagens putativas de *Citrullus lanatus*, na Kalahari Ocidental, região de Namibia e Botswana (ZOHARY et al., 2012 apud WELBAUM, 2016). Sua difusão pelo Médio Oriente, Oeste da Ásia e Índia aconteceu nos tempos antigos e alcançou os países da China e Japão nos séculos X e XVI, ficando conhecida pelos americanos nos primeiros tempos pós-colombianos (GRUBBEN; DENTON, 2004).

No Brasil, a melancia foi introduzida por escravos e, posteriormente, durante a Guerra civil americana, por agricultores sulistas com culturas norte-americanas, e atualmente é cultivada, também, em todo o território nacional. A melancia apresenta características como consistência tenra, ciclo biológico curto e sua utilização, na alimentação humana, não exige preparo industrial (FILGUEIRA, 2007).

A melancia pertence à família Cucurbitaceae, ao gênero e espécie *Citrullus lanatus* (Thunb.) Mastum & Nakai, antigamente classificada como *C. vulgaris* ou *C. citrullus* L. Tal espécie inclui grupos que são cultivadas como cultura vegetal, produzindo sementes ou frutos comestíveis, sendo *Citrullus lanatus* a cultivar de ampla distribuição mundial, para consumo humano. E a cultivar *Citrullus lanatus* var. *citroides*, uma forma silvestre cultivada no sul da África e em outras partes do mundo, é empregada principalmente para a alimentação animal (DIAS; REZENDE, 2010; WELBAUM, 2014).

Sua principal forma de consumo é do fruto *in natura*, podendo também ser consumida em produtos processados, como sucos, geleias, doces e molhos. Trata-se de um fruto hidratante, tendo água em 90% da sua composição, fonte de pró-vitamina A, vitaminas C e do complexo B, disponibilizando quantidades abundantes de licopeno (antioxidante) e aminoácido citrulina, importantes para a saúde (DIAS; REZENDE, 2010).

É uma planta anual, rasteira, herbácea, com caules longos, podendo alcançar mais de três metros de comprimento. As folhas são pecioladas, pilosas, com disposição alternada, e limbo recortado, variando de 5-20 cm de comprimento. O fruto é uma baga indeiscente com características variáveis conforme a cultivar. Nas cultivares mais comuns, o fruto é globular ou alongado, com polpa vermelha, doce e aguada e sementes escuras (Figura 1). A cor vermelha é devido ao pigmento licopeno enquanto que a cor amarela, na maioria das vezes, vem do β -caroteno, ambos carotenóides e xantofilas (GOMES, 1972; FILGUEIRA, 2007; DIAS; REZENDE, 2010; WELBAUM, 2014).

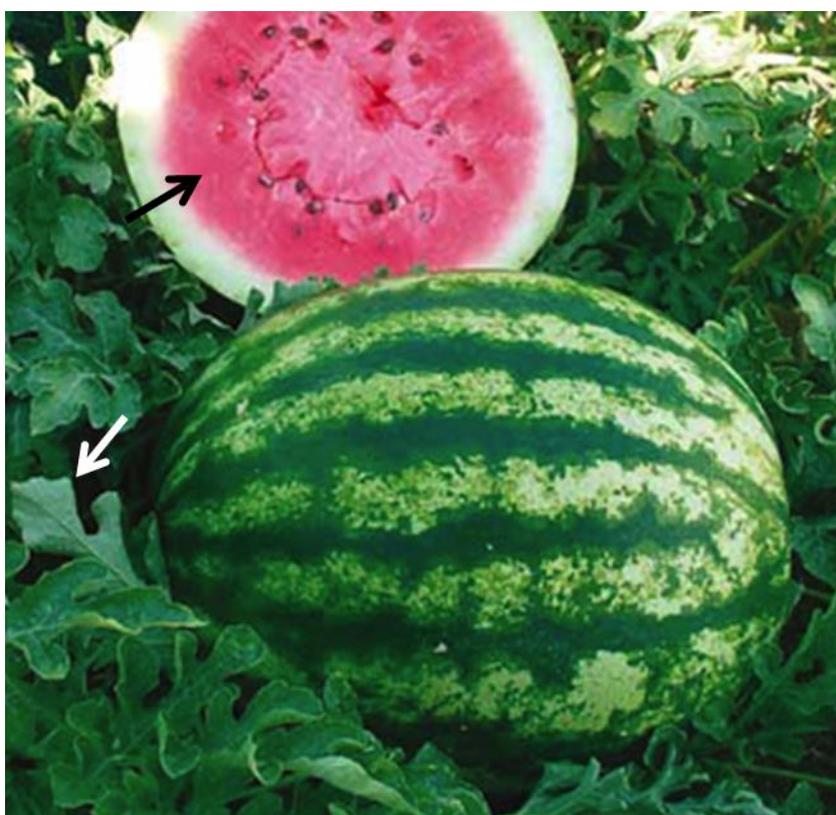


Figura 1 - Fruto e folha da melancia (cv. Crimson Sweet). Seta preta indica a polpa do fruto avermelhada e seta branca o formato da folha. Fonte: Sativa (2017).

É considerada uma planta de clima tropical, com crescimento ótimo em temperaturas de 20°C a 32°C e sensível às baixas temperaturas, não tolerando frio e geada. Seu cultivo pode variar de 75 a 120 dias, dependendo da cultivar e do ambiente. Fatores climáticos como temperatura, fotoperíodo, umidade e ventos podem afetar o crescimento, produção e, conseqüentemente, a qualidade do fruto (EMBRAPA, 2007; WELBAUM, 2014).

Por suas características de cultivo, a melancia está expandida mundialmente, em regiões tropicais, subtropical e temperado quente (GRUBBEN; DENTON, 2004). Segundo dados da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), os cinco principais países produtores de melancia no ano de 2014 (toneladas) foram: China (75 milhões), Turquia (3,9 milhões), Irã (3,5 milhões), Brasil (2,2 milhões) e Egito (2,0 milhões). No ano de 2015, o Brasil apresentou produção de 2,1 milhões e rendimento médio da produção de melancia de 22.087 (kg/ha) (IBGE, 2015a).

A importância da melancia na produção brasileira é demonstrada nos resultados da pesquisa da Produção Agrícola Municipal (2013), que a consideraram como uma das principais frutíferas no Brasil, sendo produzida praticamente em todo o país. As regiões Nordeste, Sul e Norte se destacam como os maiores produtores, apresentando uma produção de 603.015, 567.537 e 469.737 toneladas (t), respectivamente (IBGE, 2013).

Na região Norte, o estado do Tocantins destacou-se como o maior produtor de melancia em 2013, havendo a contribuição do município Lagoa da Confusão que teve um aumento de 335,5% no valor da produção, devido à expansão da área cultivada, o que evidencia a melancia como uma das principais frutíferas em expansão no Estado. No ano de 2015, a produção no Estado alcançou o quantitativo de 196.651 t, tendo como rendimento médio 20.931 kg/ha (Tabela 1) (IBGE, 2013; 2015b).

Tabela 1 - Indicativos econômicos e produtivos da melancia no Estado do Tocantins no ano de 2015.

Lavoura temporária – Melancia	
Quantidade produzida	196.651 Toneladas
Valor da produção	98.602 mil reais
Área plantada	9.395 Há
Área colhida	9.395 Há
Rendimento médio	20.931 kg/há

Fonte: IBGE, 2015b.

O município de Formoso do Araguaia (TO) também se sobressai como um dos maiores produtores de melancia no Estado, devido principalmente ao sistema de produção ser na região de várzea, com subirrigação do Projeto Rio Formoso, sendo

o período do ano com potencial na colheita considerado de Junho a Setembro (DEUS, 2016). Tal projeto foi implantado em 1979 e é considerado o maior da América Latina, consistindo na agricultura irrigada em terras contínuas. Em 2015, a produção de melancia neste município foi de 17.070 t, com rendimento médio de 30.000 kg/ha (IBGE, 2015c).

O cultivo da melancia, em quase todo o país, acontece tanto em condições de sequeiro como em regime irrigado. O primeiro consiste em um cultivo tradicional da melancia em consórcio com outras culturas ou de forma isolada no período chuvoso, geralmente de Dezembro a Março. Entretanto, o excesso de precipitação pode atrapalhar a polinização, além de afetar a qualidade dos frutos. O cultivo sob irrigação permite a exploração dessa cucurbitácea durante quase todo o ano. O método a ser utilizado na irrigação depende das condições do solo, clima, topografia e suprimento hídrico disponível. Dentre os métodos mais comuns estão a irrigação por sulcos, por aspersão e por gotejamento, sendo este último o mais eficiente e que não favorece o ataque de doenças foliares e de plantas daninhas, possibilitando a obtenção de frutos de melhor qualidade (EMBRAPA, 2007; DIAS; REZENDE, 2010).

Importantes perdas da cultura da melancia são decorrentes de doenças fúngicas que atacam a planta nos estágios vegetativo e reprodutivo. Na fase vegetativa, os fungos *Fusarium* sp., *Pythium* sp. e *Rhizoctonia* sp. provocam lesões necróticas no sistema radicular, com consequente tombamento e, na fase reprodutiva as doenças fúngicas ocasionadas por *Didymella bryoniae* e *Pseudoperonospora cubensis* resultam na secagem gradual das folhas (PEREIRA et al., 2017).

2.2 Microbioma das plantas

As plantas são colonizadas por diversos tipos de microrganismos endofíticos e epifíticos nas partes abaixo (raízes) e acima (parte aérea) do solo. A filosfera ou filoplano (Figura 2), importante habitat para os microrganismos (bactérias, leveduras e fungos filamentosos), compreende a parte aérea das plantas e, frequentemente, é dominada pelas folhas. Dependendo do tipo de planta, anual ou decídua perene, o filoplano pode ser considerado um ambiente efêmero ou de curta duração e, devido

à presença da cutícula que cobre as células epidérmicas da planta, torna-se um ambiente oligotrófico (VORHOLT, 2012).

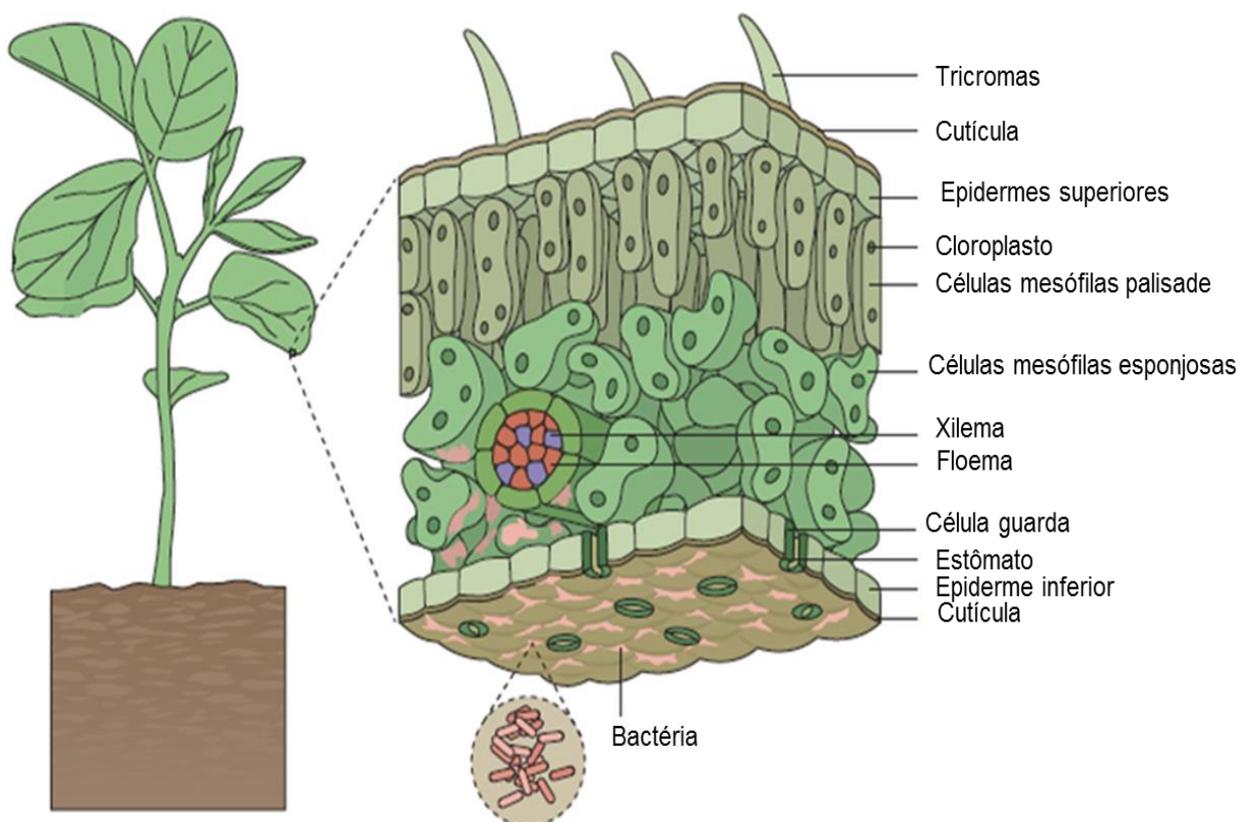


Figura 2 - Representação da seção transversal esquemática ampliada de uma folha de planta de soja. Microrganismos, particularmente bactérias (mostradas) e fungos (não mostrados), podem colonizar a superfície da folha e o apoplasto (espaço intercelular que envolve as células vegetais). Fonte: Vorholt (2012).

As folhas, por suas particularidades fisiológicas e morfológicas, como a exposição a temperaturas e umidade relativa, se tornam um habitat transitório e irregular para os microrganismos que, quando comparado à rizosfera (abaixo do solo) ou à superfície de plantas aquáticas trata-se de um habitat pobre em nutrientes (ANDREWS, 1991; LINDOW; BRAND, 2003). Entretanto, devido a essas características, somadas a irradiação incidente, os microrganismos residentes no filoplano podem servir como fontes de genes que codificam traços de tolerância ao estresse com considerável valor biotecnológico (TURNER et al., 2013).

Os microrganismos podem ser encontrados residindo em apoplastos intercelulares, em células mortas ou moribundas, e em vasos do xilema, de onde

são transportados das raízes para a parte aérea. Na parte aérea podem estar presentes nas veias, células epidérmicas, ponta e base dos tricomas e perto dos estômatos (VORHOLT, 2012). Nos frutos, podem estar presentes no mesocarpo e placenta (GLASSNER et al., 2015), dentro de espaços intercelulares de polpa e vasos do xilema da polpa, onde sugerem sua colonização por meio de estômatos na floração que se espalharam dentro dos órgãos reprodutivos da planta (COMPANT et al., 2011).

A forma de o microrganismo penetrar a planta hospedeira pode acontecer nas raízes por meio de rupturas naturais ou decorrentes da ação de enzimas produzidas pelo microrganismo, pelas pontas radiculares, e/ou pela propagação vegetativa (LEVEAU; LINDOW, 2001; TURNER et al., 2013). Sua transmissão pode ocorrer verticalmente, pelo revestimento protetor externo de uma semente, ou horizontalmente, por estruturas reprodutivas como os esporos que são movidos pelo vento ou chuva ou por um vetor, como inseto (LUGTENBERG et al., 2016).

De forma geral, todos os tecidos da planta hospedam uma comunidade microbiana. Os habitantes do filoplano, aqueles que residem próximos ou sobre o tecido vegetal, são considerados epifíticos e os que vivem dentro dos tecidos das plantas (denominado endosfera) são considerados endofíticos (TURNER et al., 2013).

O crescimento de microrganismos no filoplano é dependente de nutrientes de metabólitos que são secretados pela planta ou de componentes de materiais de fontes externas que caem na superfície da planta, podendo assim construir modos de interação com o hospedeiro conforme a necessidade, consistindo em moradores neutros, patógenos latentes ou promotores da saúde e do crescimento da planta (LIMTONG; KOOWADJANAKUL, 2012; WANG et al., 2016a).

O microbioma da planta é fortemente influenciada pelo seu genoma, pela sua idade, estando presentes em maiores concentrações em plantas mais jovens, pelo tipo de tecido da planta, por condições bióticas e abióticas e pela taxonomia e tipo de linhagem (TURNER et al., 2013; HARDOIM et al., 2015).

A fim de melhor conhecer a diversidade e o comportamento de microrganismos endofíticos e epifíticos, novas ferramentas moleculares e microscópicas têm sido utilizadas na identificação de espécies, buscando, por exemplo, compreender o processo de doenças das plantas e desenvolver e

implementar novos métodos de controle, interferindo na ação de microrganismos nocivos (LINDOW; LEVEAU, 2002; LINDOW; BRANDLS, 2003). As comunidades bacterianas e fúngicas presentes no filoplano de várias plantas têm sido identificadas utilizando técnicas como a amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dos genes rRNA (RNA ribossomal - rRNA) (TURNER et al., 2013).

Os métodos dependentes do cultivo são os mais comuns devido a sua simplicidade, porém sua análise da diversidade é limitada considerando que muitos microrganismos não crescem nos meios de cultura de isolamento padrão. De forma a complementar o cultivo e buscando uma maior diversidade de espécies cultiváveis, os meios de cultura podem ser suplementados com extratos ambientais (ANDREOTE et al., 2009). Apesar de limitado, as abordagens de isolamento são úteis quando se deseja ter o microrganismo para aplicações como inoculantes, por exemplo.

As abordagens independentes do cultivo incluem a aplicação de técnicas na detecção e análise de ácidos nucleicos (DNA e/ou RNA) presentes em amostras ambientais (DIAS et al., 2014). Entre estas técnicas, destacam-se as baseadas no uso de marcadores moleculares, tais como Polimorfismo de Tamanho de Fragmento por Restrição (T-RFLP), Polimorfismo de Conformação de Fita Simples (SSCP), Análise Automatizada do Espaçador Intergênico Ribossomal (ARISA) e Gel de Eletroforese de Gradiente Desnaturante (DGGE). Tais técnicas têm sido aplicadas em estudos da comunidade microbiana associada a plantas (ANDREOTE et al., 2009).

Ademais, a técnica de Sequenciamento de Nova Geração (NGS), associada ou não a ferramentas de metagenômica, permite adquirir uma grande quantidade de dados a partir do sequenciamento de nucleotídeos de organismos não cultiváveis, fornecendo dados sobre a composição taxonômica e a estruturação filogenética de comunidades microbianas (BERLEC, 2012; DIAS et al., 2014). Esta técnica combinada com a sondagem isotópica estável (SIP) pode auxiliar na identificação de microrganismos, que utilizam ativamente os metabólitos das plantas (BERLEC, 2012).

2.2.1 Microrganismos endofíticos e suas propriedades

2.2.1.1 Aspectos gerais

Os microrganismos endofíticos colonizam um grande número de plantas e, para serem detectados, faz-se necessário o isolamento a partir da superfície esterelizada. Não estão presentes em um órgão específico da planta, podendo ser encontrados nas raízes, folhas, caules, flores e frutos (BACON; HILTON, 2007). Por suas características diversas, sua definição é abrangente, considerando todos os microrganismos cultiváveis ou não encontrados no interior da planta hospedeira e que não causam danos aparentes (SOBRAL et al., 2014).

Nas superfícies de raízes e parte aérea da planta existem nichos nos quais o reagente químico usado na esterilização superficial não alcança, podendo proteger bactérias endofíticas particulares que, para sua confirmação, se faz necessário utilizar a microscopia óptica de alta qualidade e/ou microscopia eletrônica de transmissão (TURNER et al., 2013).

A diferença entre endofíticos, epifíticos (microrganismos que vivem na superfície das plantas) e fitopatógenos (aqueles que causam doenças em plantas) é apenas didática, havendo entre eles um gradiente de interação que os separa. Um endofítico, por exemplo, pode viver como epifítico para penetrar a planta hospedeira e, dentro da planta, sob condições de estresse, pode tornar-se um patógeno (AZEVEDO et al., 2000; SOBRAL et al., 2014). A bactéria endofítica *Pseudomonas fluorescense*, por exemplo, foi isolada de plantas com sintomas típicos da Síndrome de Distorção de Samambaia (FDS) e quando inoculadas em samambaias assintomáticas recriaram os sintomas da doença (KLOEPPER et al., 2013).

Quanto ao tempo de permanência nos tecidos das plantas, os endofíticos podem ser denominados como: **Obrigatórios** que tem o seu ciclo de vida completo na planta; **Oportunistas** que entram esporadicamente na endosfera da planta; e **Facultativos** que podem ser selecionados pela planta hospedeira ou usam a planta como um vetor para disseminação, compreendendo a grande maioria dos endofíticos (HARDOIM et al., 2015).

Quanto às funções desenvolvidas no hospedeiro, podem ser: **Comensais** em que não provocam efeitos aparentes no desempenho da planta, vivendo com os metabólitos produzidos pelo hospedeiro; **Patógenos latentes** podendo ser

prejudiciais ou não, dependendo do genótipo da planta e de fatores de estresse abiótico; e **Benéficos** conferindo efeitos como proteção contra patógenos invasores e herbívoros, além de promover o crescimento das plantas. Os endofíticos podem agir também por **mutualismo**, havendo benefícios para ambos e por **simbiose**, estabelecendo uma relação biológica próxima entre dois ou mais hospedeiros de diferentes espécies (BULGARELLI et al., 2013; HARDOIM et al., 2015).

2.2.1.2 Isolamento de microrganismos endofíticos

A obtenção de microrganismos endofíticos se dá por meio da coleta das plantas de interesse, que são colocadas em sacos plásticos e mantidas refrigeradas até a realização dos procedimentos de isolamento (STROBEL; DAISY, 2003). O isolamento de endofíticos inclui uma série de cuidados para que não ocorra o isolamento dos microrganismos epifíticos, que são aqueles que vivem na superfície do hospedeiro. Para tanto, é necessário aplicar técnicas de desinfestação superficial, cujo objetivo é a eliminação completa do microbioma externo, conservando o microbioma interno viável. De uma forma geral, realiza-se a lavagem da amostra em estudo (folhas, caules, etc.) com etanol 70%, seguido de tratamento com hipoclorito de sódio 2-3% e novamente com etanol 70%, variando os tempos de tratamento e a concentração de hipoclorito de acordo com o material (AZEVEDO, 1998; SOBRAL et al., 2014).

Outra forma de isolamento, por métodos quantitativos, permite realizar a suspensão em água ou em solução salina de tecidos tratados e macerados possibilitando uma estimativa do número de microrganismos no interior de um determinado tecido vegetal (AZEVEDO, 1998).

Os meios de cultura utilizados para o isolamento geralmente são suplementados com agentes inibidores, como os antibióticos, nos meios para fungos filamentosos e leveduras a fim de impedir o crescimento de bactérias, e de fungicida, nos meios para bactérias para inibir o desenvolvimento de fungos (AZEVEDO, 1998). O tempo e a temperatura de incubação variam conforme os grupos microbianos a serem isolados, podendo apresentar temperaturas inferiores a 20 °C e tempos de 20 a 40 dias, considerando que alguns endófitos possuem um desenvolvimento mais lento (SOBRAL et al., 2014).

2.2.1.3 Propriedades benéficas dos endófitos

O estudo de endófitos começou a ganhar importância no final dos anos 70, quando descobriram que tais microrganismos poderiam conferir proteção ao hospedeiro contra herbívoros (AZEVEDO, 1998). Estudos com fungos e bactérias endofíticas mostraram poder promover funções importantes para o crescimento e sobrevivência das plantas, como resistência às condições de estresse, alteração nas propriedades fisiológicas e produção de fitormônios, além de poder produzir toxinas, antibióticos, fármacos e outros compostos de interesse biotecnológico como, por exemplo, as enzimas (AZEVEDO et al., 2000). O interesse por este microrganismo também foi despertado buscando descobrir novas espécies microbianas, principalmente de hospedeiros tropicais, região que abrange vastas áreas agrícolas (AZEVEDO et al., 2000).

Na interação com as plantas, os endófitos **comensais** apresentam consideráveis propriedades benéficas às plantas, como a proteção contra fitopatógenos e herbívoros e a promoção do crescimento da planta (Figura 4). Nesta interação, os microrganismos (principalmente bactérias e fungos) são capazes de desenvolver funções como solubilização do fósforo, fixação de nitrogênio, produção de sideróforos, biossíntese de fitormônios, produção de compostos voláteis, proteção sobre estresse biótico e abiótico, produção de metabólitos secundários e controle biológico (HARDOIM et al., 2015).

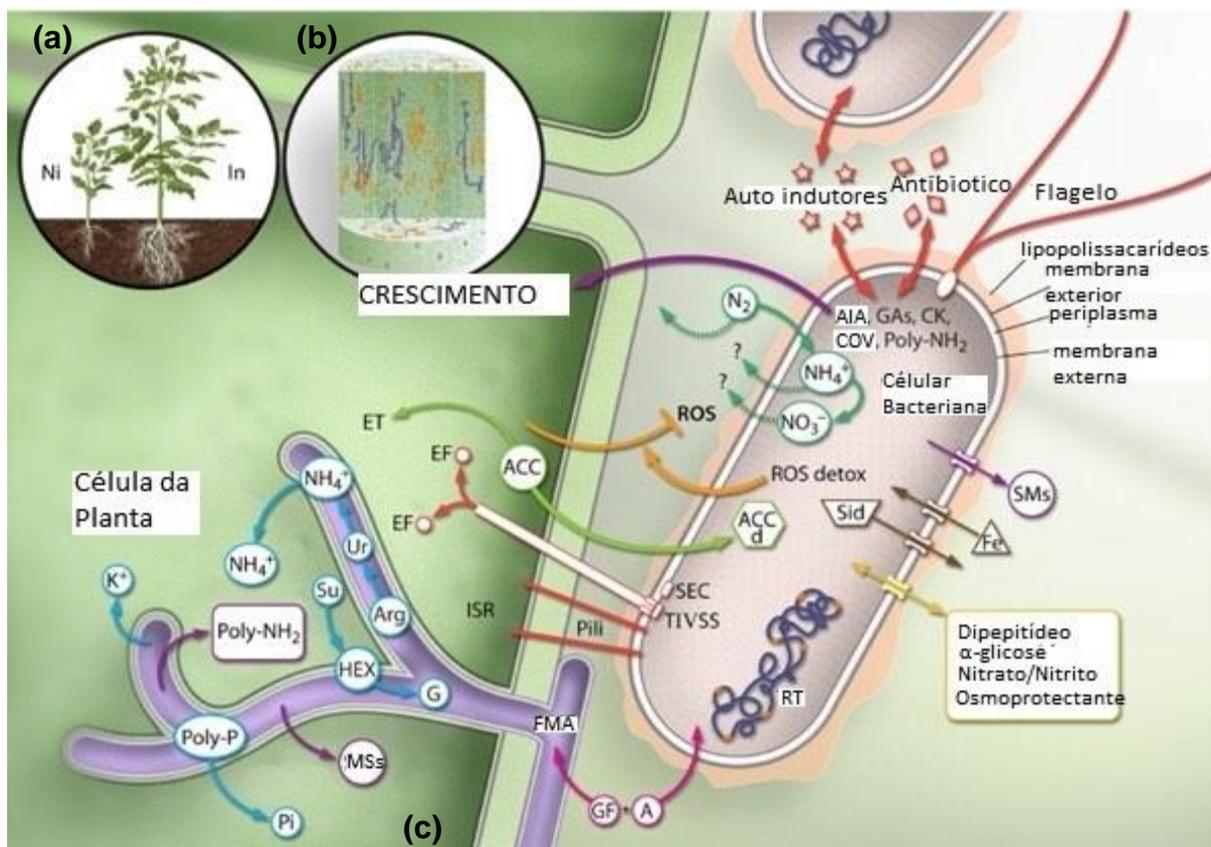


Figura 3 - Propriedades benéficas dos endófitos. Fonte: Haroim et al. (2015, p.301).

(a) Comparação de plantas inoculadas (In) com microrganismos benéficos e plantas não inoculadas (Ni). (b) Demonstração de bactéria (laranja) e fungo micorrízico arbuscular (FMA) (roxo) colonizados no interior dos tecidos das plantas. (c) Interação entre bactérias e fungos (FMA) endófitos com as células das plantas e os microrganismos vizinhos. O fungo endófito pode formar estruturas especializadas, chamadas arbúsculos, onde ocorre a troca de fontes de carbono derivadas de plantas, principalmente sacarose (Su), por elementos de fósforo (Pi), nitrogênio (NH_4^+) e potássio (K^+) (azul). A sacarose citoplasmática da planta é transportada para o espaço peri-arbuscular, onde é convertida a hexose (HEX) e convertida em glicogênio (G) para o transporte de longa distância. Fósforo e nitrogênio são transportados dentro do citoplasma fúngico como grânulos de polifosfato (Poly-P), que são convertidos em Pi e arginina (Arg) no arbúsculo. Pi é transportado para o citoplasma hospedeiro, enquanto Arg é inicialmente convertido em uréia (Ur) e então em amônio (NH_4^+). Os hormônios vegetais fúngicos e bacterianos, como as auxinas (AIA), as giberelinas (GAs), as citoquininas (CKs), os compostos orgânicos voláteis (COVs) e as poliaminas (Poly- NH_2), bem como os metabólitos secundários (MSs) são transferidos ao hospedeiro (violeta). Várias estruturas bacterianas, como flagelo, pili, máquinas do sistema de secreção (ex. TIV, SS e SEC), e lipopolissacarídeos, bem como proteínas e moléculas derivadas de bactérias, tais como efetores (EF), autoindutores e antibióticos, são detectados por células hospedeiras e desencadeiam a resposta de resistência sistêmica induzida (ISR) (vermelho). ACC, o precursor direto do etileno (ET), é metabolizado por bactérias através da enzima ACC desaminase (ACCd), melhorando assim o estresse abiótico (verde claro). Uma gama de enzimas reativas de desintoxicação de espécies de oxigênio (ROS detox - ERO) também pode melhorar o estresse induzido por plantas (laranja). Os endófitos bacterianos diazotróficos são capazes de fixar o nitrogênio atmosférico (N_2) e podem transportar ativamente NH_4^+ e nitrato (NO_3^-) para o hospedeiro (verde escuro). Processos de produção bacteriológica de sideróforo (Sid) e absorção de (Fe), que estão envolvidos na promoção do crescimento de plantas, biocontrole e fitorremediação são apresentados em marrom. Exemplos de vários substratos nos quais as proteínas transmembranares são enriquecidas entre endófitos são mostrados em amarelo. Reguladores transcricionais (RT) também são mostrados (laranja). Comunicações e interações entre as células de microrganismos que habitam no interior dos tecidos das plantas são promovidas pelo fator de crescimento (FC), pelo antibiótico (A) (fúcsia) e pelas moléculas auto-indutoras.

Os endofíticos (bactérias e fungos) solubilizam o fósforo presente no solo pela produção de ácidos orgânicos ou fosfatases, liberando-o na forma de fosfato inorgânico dissolvido (BULGARELLI et al., 2013). Alguns endofíticos são capazes de produzir sideróforos para a aquisição de ferro e biossintetizam fitormônios como auxinas, giberilinas e citocininas, importantes na promoção do crescimento e desenvolvimento da planta (HARDOIM et al., 2015).

Particularmente, as bactérias endofíticas diazotróficas fixam o nitrogênio atmosférico (N_2), transportando para o hospedeiro amônia (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-), compostos relacionados à promoção do crescimento da planta (BULGARELLI et al., 2013). A enzima bacteriana ACC desaminase também está associada a esta característica, atuando sobre os níveis de etileno buscando sua redução e prevenindo sua sinalização sob condições de estresse da planta (LODEWYCKW et al., 2002; HARDOIM et al., 2015).

As bactérias endofíticas também são capazes de interferir no estado de defesa das plantas pela indução de transcrição de genes de resistência (Resistência Sistêmica Induzida - ISR) (LODEWYCKW et al., 2000), produção de composto antimicrobiano (AKELLO et al., 2007) ou por produção de enzimas e outros metabólicos que interferem no desenvolvimento de uma praga (LIU et al., 1995; AKELLO et al., 2007). A indução de respostas sistêmicas consiste na regulação indireta de expressão de genes, pelo aumento de compostos que auxiliam na ativação de sinais defesa da planta (ALBORN et al., 1997). Tais compostos podem ser indutores químicos, como por exemplo, a quitosana, que estimula alterações celulares, caracterizadas pelo aumento de papilas ricas em calose no interior da célula, na epiderme e córtex exterior (VAN PEER et al., 1991; BENHAMOU et al. 1998).

Os fungos também induzem respostas de defesas do hospedeiro, agindo com mudanças estruturais e bioquímicas, como a deposição de material de parede celular de planta no local da infecção e o aumento da atividade de diversas enzimas, como peroxidases e quitinase, e outras proteínas relacionadas à patogênese (PUNJA; UTEKED, 2003).

Os metabólitos produzidos pelos endófitos, principalmente por fungos filamentosos, incluem anticancerígenos, antioxidantes, imunossupressivos e antivirais de interesse farmacêutico e medicinal (VERMA et al., 2009). Alguns

fungos, como *Taxomyces andreanae*, possui a capacidade de produzir taxol, composto natural da planta hospedeira *T. brevifolia*, que é um agente antitumoral (STIERLE et al., 1993).

Dentre os fitormônios produzidos pelos endofíticos (bactérias e fungos) as auxinas vêm sendo estudadas por envolverem um grande número de processos de desenvolvimento da planta. A auxina exógena deve ser percebida pela planta e convertida em um sinal, para assim desencadear uma resposta biológica. Podem promover a formação de raízes laterais, que ancoram a planta firmemente no solo, de pêlos radiculares, aumentando a área de superfície, e inibir o alongamento da raiz. O ácido indolacético (AIA) é o componente mais abundante capaz de cumprir as ações envolvidas no desenvolvimento da planta e respostas ao meio ambiente (SAUER et al., 2013; SUN et al., 2014). Para detectar a produção de auxina pelos microorganismos há vários métodos baseado em efeitos biológicos e em propriedades físico-químicas. A técnica colorimétrica pela detecção do ácido-indolacético por meio da utilização do reagente Salkowski é simples, rápida e barata, permitindo a análise rápida de um grande número de linhagens microbianas (GLICKMANN; DESSAUX, 1995).

Outra propriedade importante realizada pelos endofíticos é o biocontrole que suprime os patógenos, direta ou indiretamente, conferindo proteção à planta. O biocontrole por endofíticos tem sido estudado em condições laboratoriais e também em situações de campo, buscando a comercialização de produtos biológicos (BULGARELLI et al., 2013).

Os agentes de controle biológico comercializados tem uma ampla gama de hospedeiros e encontra sua aplicação em vários tipos de culturas comerciais e na aplicação pós-colheita de frutos. Os inoculantes microbianos apresentam vantagens quando comparados com pesticidas químicos/sintéticos, como: maior segurança, redução de danos ambientais, eficiência em pequenas quantidades e maior decomposição (BERG, 2009). A maioria dos bioprodutos são comercializados na forma de pó ou grânulos A Tabela 2 traz bioprodutos comercializados de bactérias e leveduras.

Tabela 2 - Bioprodutos comercializados a base de bactérias e leveduras e suas empresas produtoras.

Bactérias				
Microrganismo	Patógeno	Aplicação	Bioproduto	Empresa
<i>Bacillus subtilis</i> strain GB03	<i>Rhizoctonia</i> e <i>Fusarium</i> spp.	Sementes de algodão, ervilhas, feijões, amendoins e milho	Kodiak	(Gustafson); Bayer CropScience
<i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> e <i>B. megaterium</i>	<i>Rhizoctonia</i> , <i>Pythium</i> , <i>Fusarium</i> e <i>Phytophthora</i>	Bagas, citrus, cucurbitáceas, uvas, legumes, raízes e tubérculos, frutas tropicais	Companion	Growth Products
<i>Bacillus pumilus</i> GB34	Patógenos fúngicos transmitidos pelo solo	Cebola, maçã, morango e soja	Rotex	(Gustafson); Bayer CropScience
<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Rhizoctonia solani</i>	Batatas, vegetais, grama e tremoço	Proradix	Sourcon Padena
<i>Streptomyces griseoviridis</i> K61	<i>Phomopsis</i> spp., <i>Botrytis</i> spp., <i>Pythium</i> spp., <i>Phytophthora</i> spp.	Sementes de vegetais, ervas, plantas ornamentais, árvores e coníferas	Mycostop	Kemira Agro Ou
Leveduras				
<i>Pseudozyma flocculosa</i> PF-A22 UL	<i>Sphaerotheca pannosa</i> e <i>Sphaerotheca fuliginea</i>	Roseira e pepino	Sporodex L	Plant Products Company Ltd.
<i>Candida oleophila</i> I-182	<i>Penicillium digitatum</i> e <i>Botrytis</i>	Pós-colheita de citrus e frutos de caroço	Aspire	Ecogen Inc.
<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Erwinia amylovora</i>	Pomáceas e ornamentais	Blossom Protect™	Biofa AG
<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Botrytis</i> , <i>Penicillium</i> e <i>Monilia</i>	Pós-colheita de frutos e pomáceas	BoniProtect	Biofa AG
<i>Metschnikowia fructicola</i>	<i>Penicillium digitatum</i> , <i>Penicillium italicum</i> , <i>Penicillium expansum</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i> e <i>Aspergillus niger</i>	Pós-colheita de frutos de caroço, uvas, morango, batata e cenoura	Shemer®	Agrogreen Minrav Infrastrutres
<i>Cryptococcus albidus</i>	<i>Botrytis</i> e <i>Penicillium</i>	Pós-colheita de maçãs e citrus	Yield Plus®	Anchor Yeast

Fonte: Adaptado de BERG, 2009; BETTIOL et al., 2012.

Neste contexto, relatos de biocontrole com leveduras endofíticas ainda são limitados e estudos têm apresentado isolados de leveduras como produtoras de

ácido indolacético, de diferentes espécies, sugerindo ser uma característica comum a vários tipos de leveduras (XIN et al., 2009; LIMTONG; KOOWADJANAKUL, 2012; LIMTONG et al., 2014; SUN et al., 2014; NASANIT et al., 2015).

As leveduras apresentam vantagens como agentes de controle biológico das doenças pós-colheita. Elas são capazes de colonizar rapidamente e sobreviver nas superfícies dos frutos durante longos períodos de tempo, sob diferentes condições, utilizar nutrientes disponíveis para proliferação, limitando sua disponibilidade para o patógeno (JONES; PRUSKY, 2002). Quando aplicadas à folhagem podem reduzir a infecção primária, além de reduzir e impedir o estabelecimento ou desenvolvimento de fitopatógenos, colonizando feridas e outros tecidos (PUNJA; UTKHEDE; 2003).

O biocontrole de fungos fitopatogênicos por leveduras pode ocorrer por antibiose, micoparasitismo, produção de enzimas líticas, resistência induzida, formação de biofilme e competição por nutrientes e espaço (Figura 4) (SPADARO; DROBY, 2015).

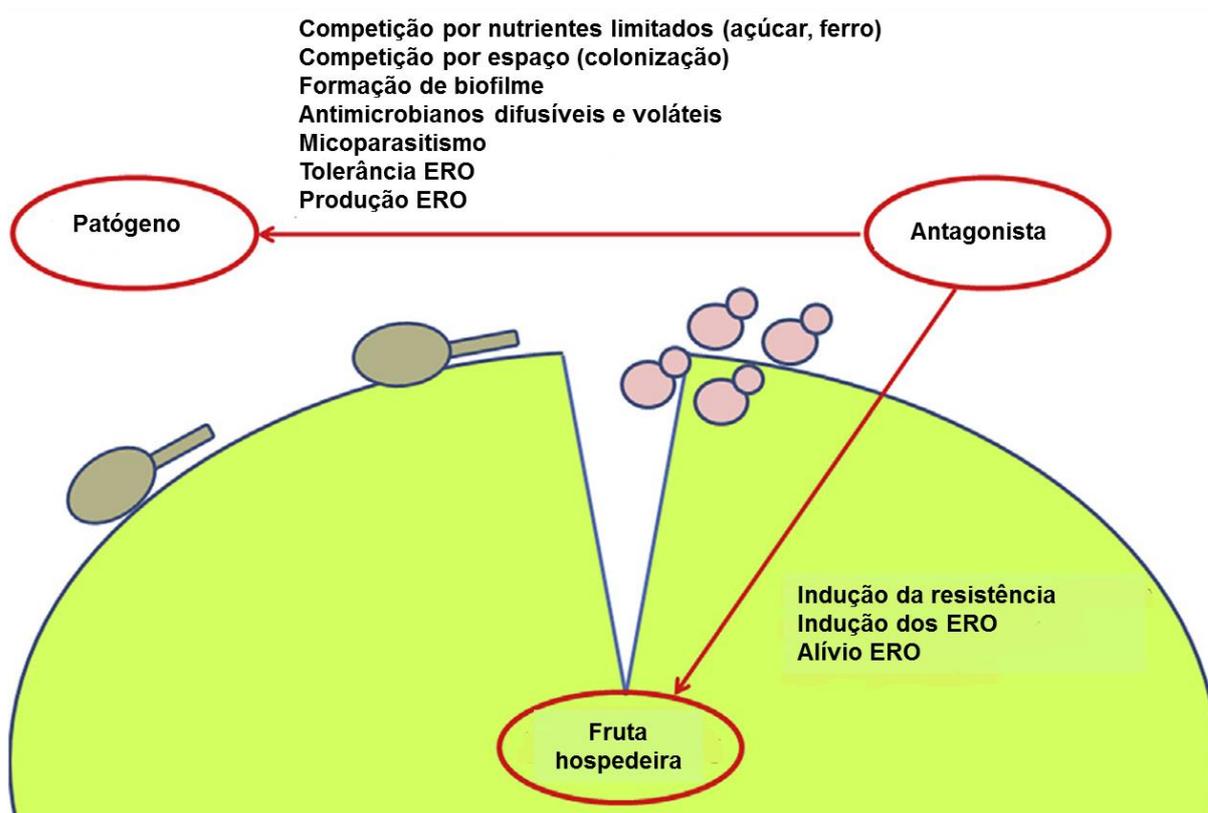


Figura 4 - Modos de ação utilizados pelos agentes de biocontrole, na interação com o patógeno e o fruto-hospedeiro. ERO: espécies reativas de oxigênio. Fonte: Spadaro; Droby (2015).

Na competição por espaço, as leveduras geralmente aderem à superfície do fruto formando um biofilme que cobre toda a área da ferida e aumenta o processo de cicatrização (SPADARO; DROBY, 2015). A levedura compete por nutrientes podendo deslocar o fitopatógeno de forma a prevenir a infecção. Algumas espécies de leveduras desenvolvem toxinas e proteínas *killer* que são letais para algumas células microbianas, além de produzirem de compostos voláteis, como o éster (STROBEL; DAYSE, 2003). No parasitismo as enzimas glucanases, quitinases e proteases, produzidas pelo agente de biocontrole, são capazes de quebrar as estruturas fúngicas do fitopatógeno (PUNJA; UTKHEDE; 2004).

A levedura deve ser capaz de tolerar níveis altos de espécies reativas de oxigênio (ERO) que são produzidos pela planta em resposta da presença do microrganismo (SPADARO; DROBY, 2015). ERO são subprodutos do metabolismo celular regular gerado pela interrupção do sistema de transporte de elétrons durante condições de estresse (BREUSEGEM et al., 2001). Macarisin et al. (2010) sugerem que as leveduras antagonistas possuem a capacidade de auto-gerar e, possivelmente, estimular uma resposta oxidativa no tecido do hospedeiro.

Na análise *in vitro*, efeitos inibitórios têm sido atribuídos a diferentes causas, tais como: obstruções no crescimento, interações hiperparasitárias, mudanças do pH, alterações nutrientes no meio e produção de antibióticos. A ocorrência de zonas de inibição entre o antagonista e o patógeno sobre meio de cultura contendo ágar e a inibição do crescimento em culturas líquidas são consideradas, principalmente, como resultado da produção de antibióticos (FOKKEMA, 1976).

2.2.2 Caracterização molecular de microrganismos endofíticos

Abordagens dependentes e independentes de cultivo microbiano são utilizadas para o estudo detalhado da diversidade e da funcionalidade de comunidades microbianas de diferentes ambientes. No caso de microrganismos isolados, o sequenciamento e análise de genes específicos permite identificação taxonômica em nível de espécie (TURNER et al., 2013).

A identificação de espécies de microrganismos baseia-se na obtenção do material genético (DNA), o qual pode ser analisado aplicando-se técnicas moleculares rápidas como Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado

(ARDRA), Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso (RAPD), Polimorfismo de Tamanho do Fragmento Amplificado (AFLP), Polimorfismos do Comprimento do Fragmento de Restrição (RFLP) e Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) (KURTZMAN et al., 2011; MARTINS et al., 2014).

A PCR é uma técnica que permite obter *in vitro* várias cópias de um determinado segmento de DNA, a partir de quantidades mínimas do mesmo, por meio de ciclos repetidos de sínteses mediadas por iniciadores sintéticos (*primers*), baseadas no mecanismo utilizado pelas células durante a replicação (BUFERRY, 1997; FUNGARO, 2000; WATSON et al., 2006).

A amplificação dos segmentos de DNA acontece por etapas e são necessários: ter o DNA molde (região de interesse), selecionar o segmento a ser amplificado, obter oligonucleotídeos específicos para esse segmento, utilizar a enzima DNA-polimerase e termociclador (FUNGARO, 2000). Na primeira etapa da PCR, o DNA é desnaturado pelo calor e anelado aos oligonucleotídeos; em seguida, a DNA-polimerase sintetiza DNA sobre o molde de fita simples, estendendo-a a partir dos oligonucleotídeos (*primers*) e produzindo DNA de fita dupla em ambas as fitas de DNA. Posteriormente, inicia-se um novo ciclo de desnaturação e síntese de DNA a partir do DNA obtido na etapa anterior, utilizando os mesmo oligonucleotídeos. Assim, a amplificação da região de interesse ocorre de maneira geométrica, adicionando-se ciclos repetitivos de desnaturação e síntese de DNA até obter uma quantidade analisável de DNA de fita dupla (WATSON et al., 2006).

Considerando o fragmento de DNA ribossômico a ser amplificado e analisado, este pode apresentar regiões altamente conservadas e outras variáveis, o que permite a análise de diferentes níveis taxonômicos. Portanto, para a detecção da espécie de um microrganismo, por exemplo, é necessário conhecer as sequências de nucleotídeos da região de interesse para o uso de oligonucleotídeos específicos que propiciem sua amplificação (FUNGARO, 2000; MARTINS et al., 2014).

Para o estudo de bactérias os fragmentos amplificados podem ser o 16S ou o 23S rDNA (Figura 5). A região gênica 16S é utilizada para analisar a diversidade entre isolados distantes filogeneticamente, devido ao seu conteúdo de informação, natureza conservada e distribuição universal (LANE, 1985; MARTINS et al., 2014).



Figura 5 - Agregado gênico do rDNA em bactérias. 16S, 23S e 5S: regiões do DNA ribossomal; ITS: *Internal Transcribed Spacer* (Espaçadores Transcritos Internos). Fonte: Martins et al. (2014).

No caso dos fungos leveduriformes, as regiões gênicas e intergênicas consistem em 18S, ITS1, 5.8S, ITS2, 26S e 5S (Figura 6). A região 18S é a mais conservada, sendo utilizada para comparação de organismos pouco relacionados, enquanto que a região 26S é mais variável, tornando-se apropriada para comparação de diferentes gêneros e espécies. O domínio variável D1/D2 da região 26S permite a identificação de espécies e a realização de análises filogenéticas, proporcionando um reconhecimento mais fácil de espécies estreitamente relacionadas, e é utilizado na determinação de espécies de muitas leveduras (KURTZMAN; ROBNETT, 1998; FELL et al., 2000; KURTZMAN et al. 2011; MARTINS et al., 2014).

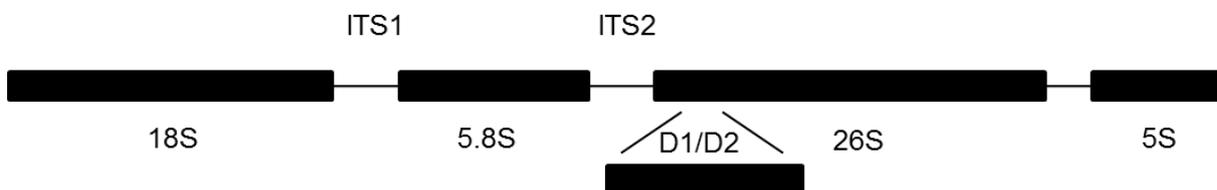


Figura 6 - Agregado gênico do rDNA em fungos e leveduras. 18S, 5.8S, 26S e 5S: regiões do DNA ribossomal; ITS: *Internal Transcribed Spacer* (Espaçadores Transcritos Internos); Região D1/D2: subunidade grande do RNA ribossomal. Fonte: Adaptado de Yaazh Xenomics (2017).

A análise das sequências envolve a busca e comparação das mesmas depositadas em banco de dados tais como Genbank, Mycobank, Ribosomal Database Project (RPD para o estudo filogenético. As sequências de interesse obtidas e as de linhagens de referência (*type strain*) são selecionadas e submetidas à análise filogenética, utilizando ferramentas de bioinformática, como o programa MEGA e o Geneious, que realizam o alinhamento das sequências em pares e calculam as distâncias genéticas entre elas, as quais são usadas para construção da árvore filogenética (MARTINS et al., 2014).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta das amostras de frutos e folhas de melancia

Os primeiros frutos explorados estavam maduros e foram obtidos junto ao comércio de Brasília-DF, selecionados pela sua maturação, no período de Abril a Maio de 2016. Por outro lado, foram coletados frutos em estado avançado de maturação de lavouras comerciais da cultivar Manchester no município de Formoso do Araguaia (11° 51' 08.3" S 49° 42' 30.4" W) em Junho de 2016. Foram selecionados 05 frutos em sistema de amostragem ao acaso, em estágio de maturação avançada, com características da casca amarelada e de aspecto mole, mas sem estar com rachaduras.

A obtenção das folhas de melancia foi realizada em outra lavoura comercial, pertencente ao Projeto Rio Formoso (11° 49' 24.1" S 49° 32' 37.0" W), também da cultivar Manchester. As folhas foram coletadas em dois estágios de desenvolvimento, no início da plantação (Junho/2016) e ao final (Setembro/2016). Para a coleta, foram realizadas as escolhas dos pontos junto ao mapeamento da lavoura comercial, buscando garantir ampla representatividade das amostras em relação à área. Neste sentido, as folhas das plantas de melancia coletadas foram de ramificações inteiras sadias, mantendo o cuidado para danificar o mínimo possível o tecido foliar.

Os frutos e folhas coletados de Formoso do Araguaia foram acondicionadas em sacos plásticos e transportadas em caixas térmicas com gelo, a fim de evitar a contaminação externa e o aquecimento das amostras, permanecendo refrigeradas até a execução do experimento conforme metodologia de Sobral et al. (2014).

3.2 Procedimentos de isolamento de microrganismos endofíticos da melancia

Os procedimentos de isolamento para folha e fruto de melancia foram desenvolvidos a fim de selecionar microrganismos endofíticos. Os isolamentos foram realizados no Laboratório de Genética e Biotecnologia (LGB), da Embrapa Agroenergia, Brasília – DF, e no Laboratório Manejo Integrado de Pragas, na Universidade Federal do Tocantins – Campus de Gurupi.

3.2.1 Folhas

A partir da obtenção das folhas foram testadas quatro condições de esterilização da superfície do tecido, de acordo com metodologia proposta por Azevedo et al. (2014) para desinfestação superficial com hipoclorito (2-3%) (Tabela 3), adaptadas para a eficiência de desinfestação de folhas de melancia.

3.2.1.1 Isolamento por fragmentação

O isolamento por fragmentação foi realizado conforme metodologia de Azevedo et al. (2014) com duas amostras: folhas novas, obtidas de plantas jovens do início da plantação, e folhas obtidas de plantas do final de ciclo.

Para tanto, foram testadas quatro condições de desinfestação superficial, utilizando os reagentes etanol 70% e hipoclorito 2,5%, variando o tempo de exposição para cada reagente da desinfestação (Tabela 3).

Tabela 3 - Condições de esterilização testadas para a desinfestação da superfície da folha de melancia (*Citrullus lanatus*).

Condições de Desinfestação	Etanol 70%	Hipoclorito (2,5%)	Etanol 70%
Condição 1	15 segundos	45 segundos	15 segundos
Condição 2	30 segundos	90 segundos	30 segundos
Condição 3	60 segundos	180 segundos	60 segundos
Condição 4	90 segundos	240 segundos	90 segundos

As folhas sadias foram selecionadas e realizou-se a desinfestação superficial das amostras, testando-se as três condições descritas acima, finalizando com três lavagens em água destilada esterilizada (Figura 7). Para as folhas de final de ciclo, antes da desinfestação, realizou-se a lavagem em água corrente para a retirada das sujidades grosseiras e para a desinfestação, a cada bateria de 15 folhas, efetuou-se a troca dos reagentes.

De acordo com os procedimentos realizados por Sobral et al. (2014) para comprovar a efetividade da desinfestação, uma alíquota 100 µL da última água de lavagem de cada condição foi coletada e plaqueada nos meios de cultura utilizados

para o isolamento: Tryptic Soy Broth – TSB 5% (Difco) + 15 g de ágar (Dfco), preparado com fungicida benomyl (50 µg/mL), Yeast Peptone Dextrose Agar - YPD Agar (Sigma) e PDA Potato Dextrose Agar – PDA (Himedia), acrescentados do antibiótico estreptomicina (50 µg/mL).



Figura 7 - Procedimentos realizados na desinfestação da superfície da folha de melancia, sendo a sequência de reagentes: etanol 70% (pote 1), hipoclorito (pote 2), etanol 70% (pote 3) e água destilada autoclavada (pote 4, 5 e 6).

Posteriormente, as folhas foram cortadas seguindo a metodologia de Azevedo et al. (2014) adaptando em fragmentos de 1 cm² e, em cada placa, foram inoculados sete fragmentos de folhas, em triplicata, para o isolamento com folhas novas e em oito repetições para o isolamento com folhas de final de ciclo (Figura 8). Foram utilizados os meios de cultura citados acima Tryptic Soy Agar - TSA 5% para bactérias, YPDA e PDA para leveduras e fungos filamentosos, acrescentados do fungicida benomyl (50 µg/mL) e do antibiótico estreptomicina (50 µg/mL), respectivamente, para o isolamento com folhas novas, e com os antibióticos cloranfenicol (50 µg/mL), cefoxitina (100 µg/mL) e estreptomicina (50 µg/mL), no isolamento com folhas de final de ciclo. As placas para crescimento de bactérias e leveduras foram incubadas em estufa a 28 °C e as placas para crescimento de

fungos filamentosos em câmara de crescimento tipo Biological Oxygen Demand - B.O.D. a 24 °C por 8 dias.

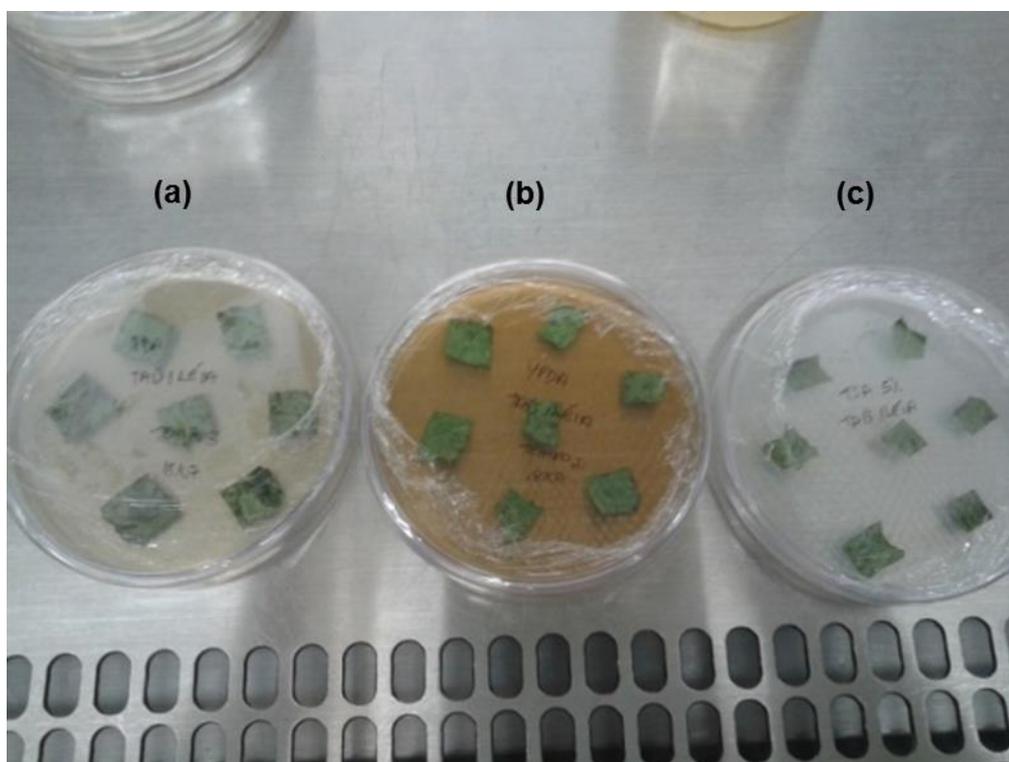


Figura 8 - Procedimento para obtenção de microrganismos endofíticos de fragmentos de folhas de melancia nos meios **(a)** PDA, **(b)** YPDA e **(c)** TSA 5%.

3.2.1.2 Isolamento por trituração

O isolamento por trituração foi realizado apenas com as amostras obtidas de final de ciclo, com o restante dos fragmentos cortados. Seguindo a metodologia proposta por Azevedo et al. (2014), as amostras foram picotadas e maceradas com pistilos em almofariz, com 10 mL de tampão Phosphate Buffered Saline – PBS (8 g/L de NaCl, 0,3/L g de KCl, 1,44 g/L de Na_2HPO_4 , 0,24 g/L de KH_2PO_4 , pH 7,4), até formar uma pasta verde. O macerado foi então transferido para frasco do tipo Erlenmeyer com pérolas de vidro estéreis (Figura 9), e incubado em agitador com temperatura de 28 °C e agitação de 200 rpm, por 60 minutos, para a liberação dos microrganismos dos tecidos.

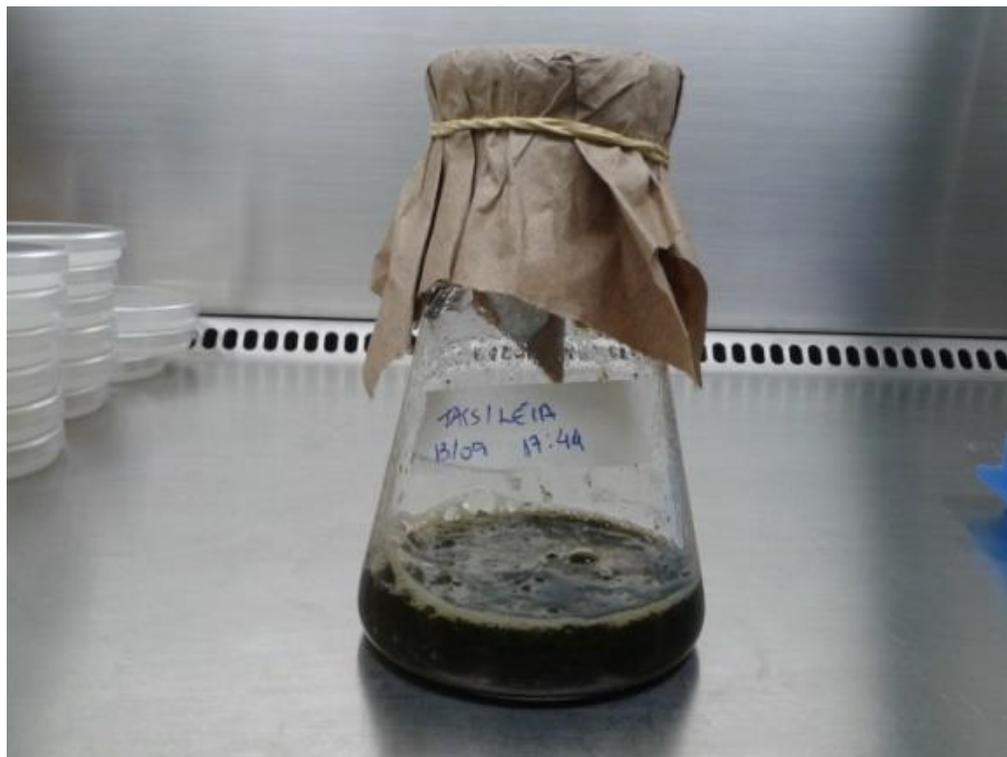


Figura 9 - Macerado de folhas de melancia com tampão PBS e pérolas de vidro obitido para o isolamento por trituração.

Posterior ao período de incubação, 100 μ L do macerado foram diluídos em 900 μ L de tampão PBS até 10^{-6} e alíquotas de 100 μ L de cada diluição e do macerado sem diluir foram plaqueadas, em triplicata, pela técnica de espalhamento com alça de Drigalski descartável, nos mesmos meios utilizados no isolamento por fragmentação. As placas foram incubadas em estufa a 28 °C para bactérias e leveduras, e em B.O.D. a 25 °C para fungos, por até 10 dias ou até se obter colônias de microrganismos.

As placas com fragmentos foram observadas diariamente e, a contagem do número de fragmentos com microrganismos foi realizada com 2, 5 e 7 dias de incubação. Ao final dos 7 dias de incubação, calculou-se a frequência de isolamento (FI) que avalia a número de fragmentos que apresentaram crescimento microbiano em relação ao número total de fragmentos avaliados, seguindo a metodologia de Azevedo et al. (2014). A frequência de isolamento (FI) foi calculada usando a fórmula:

$$FI = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de fragmentos com crescimento microbiano}}{\text{N}^{\circ} \text{ total de fragmentos foliares}}$$

Os fragmentos que não apresentaram crescimento depois de 6 dias foram repicados para uma nova placa e incubados sob as mesmas condições, por mais 10 dias.

3.2.2 Frutos

Todos os frutos foram limpos com a mesma técnica seguindo a metodologia de Strobel (2002), exceto o fruto utilizado para a obtenção do concentrado. Primeiramente, foram lavados em água corrente, utilizando esponja e sabão para a retirada das sujidades e, em seguida foram imersos em etanol 70% por 30 minutos e secos dentro do fluxo laminar. O descasque foi realizado com o auxílio de uma faca flambada e a retirada da polpa com uma concha de alumínio também flambada, efetuando esses procedimentos dentro de capela de fluxo laminar (Figura 10).



Figura 10 - Fruto de melancia obtido de Brasília – DF processado para isolamento de microrganismos endofíticos a partir da polpa retirada do fruto descascado. Procedimento realizado em capela de fluxo laminar.

3.2.2.1 Fruto maduro

Foram realizados os isolamentos a partir do concentrado do suco de melancia, do macerado da polpa (trituração), por enriquecimento da amostra e por filtração em membrana, sendo os três últimos com frutos obtidos de Brasília – DF.

3.2.2.1.1 Isolamento a partir do concentrado de melancia

Especificamente neste isolamento, o fruto foi apenas lavado, e o procedimento de descasque e trituração foi realizado em ambiente aberto, mas com utensílios higienizados em etanol 70%. Para a obtenção do concentrado utilizou-se a metodologia de Massa et al. (2014), com modificações, em que a polpa foi triturada e a sua cocção ocorreu a 95 °C por 30 minutos. O concentrado foi acondicionado em refrigeração (4 °C) e, após 10 dias, observaram-se indícios de fermentação. Buscando isolar leveduras, foi realizado o plaqueamento da amostra por estria de esgotamento em meio YPDA (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona, 20 g/L de dextrose e 15 g/L de ágar), PDA (KASVI) e suco de melancia + agar conforme Azevedo et al. (2014). Estes procedimentos foram realizados no Laboratório de Processamento de Alimentos e Manejo Integrado de Pragas (UFT – Gurupi). As placas contendo colônias foram transportadas para a Embrapa Agroenergia para as etapas de purificação, preservação e caracterização.

3.2.2.1.2 Isolamento da polpa macerada e enriquecida

Os isolamentos foram realizados por trituração para a obtenção do macerado da polpa e do enriquecimento do macerado da polpa do fruto obtido do comércio de Brasília – DF.

Foi utilizada uma maior variedade de meios de cultura como Actinomycete Isolation Agar (Fluka), M9 Broth (Fluka) + ágar, Água + ágar, Nutrient Agar (Difco) e R₂A Agar (Difco), além do meio TSA (Difco) 5%, adicionados de fungicida benomyl (50 µg/mL) para bactérias, e os meios Malt Extract Broth (Sigma) + ágar, Água + ágar, Czapek Solution Agar (Difco), e os meios PDA (Himedia) e YPDA (Sigma), adicionados do antibiótico penicilina (100 µg/mL) para leveduras e fungos filamentosos (AZEVEDO et al., 2014).

Para obter o macerado da polpa, seguiu-se a metodologia de Azevedo et al. (2014) em que a polpa foi macerada em almofariz com pistilo e efetuou-se a diluição seriada com 100 µL em 900 µL de tampão PBS até diluição 10^{-7} . Para o plaqueamento foram utilizados 100 µL de cada diluição e do não diluído, sendo inoculadas nos devidos meios de cultura com o auxílio de pérolas de vidro autoclavadas. Para bactérias foram plaqueadas alíquotas de todas as diluições até diluição 10^{-7} e para as leveduras, até a diluição 10^{-6} . O experimento foi realizado em triplicata. As placas com os meios para bactérias e leveduras foram incubadas em estufa a 28 °C e as placas com os meios para fungos, em B.O.D. a 24 °C, sendo observadas diariamente por um período de 30 dias, devido ao fato de alguns microrganismos endófitos apresentarem crescimento lento.

Para o isolamento por enriquecimento, cerca de 200 mL do macerado foram transferidos para frascos do tipo Erlenmeyer estéreis e colocados em incubadora digital (Thermo Scientific) a 28 °C e agitação a 200 rpm e em ambiente refrigerado (4°C), ambos por 10 dias. Posterior a este período realizou-se a diluição seriada das amostras em tampão PBS, até 10^{-7} para a amostra refrigerada e até 10^{-14} para a amostra do shaker, plaqueando-as por espalhamento, em duplicata, nos meios YPDA, adicionado do antibiótico penicilina (100 µg/mL), e TSA 5%, suplementado com o fungicida benomyl (50 µg/mL) e incubando-as em estufa a 28 °C por 2 dias.

3.2.2.1.3 Isolamento por filtração em membrana

O suco foi obtido triturando a polpa do fruto de melancia em liquidificador industrial e filtrando-o em papel filtro para a retirada do bagaço. Em seguida, o volume de 5 mL de suco foi filtrado em cada uma das membranas de 0,45 µm e 0,22 µm (Merckmillipore), a fim de concentrar a amostra, conforme metodologia de Mulvany (1969). As membranas filtradas foram inoculadas invertidas no centro das placas, em duplicata, de 0,45 µm nos meios de cultura YPDA (Sigma) e suco + 15 g de ágar para leveduras, e de 0,22 µm, nos meios TSA (Difco) 100%, TSA 5% e suco + 15 g de ágar para bactérias (Figura 11). As placas foram incubadas em estufa a 28 °C por aproximadamente 30 dias.

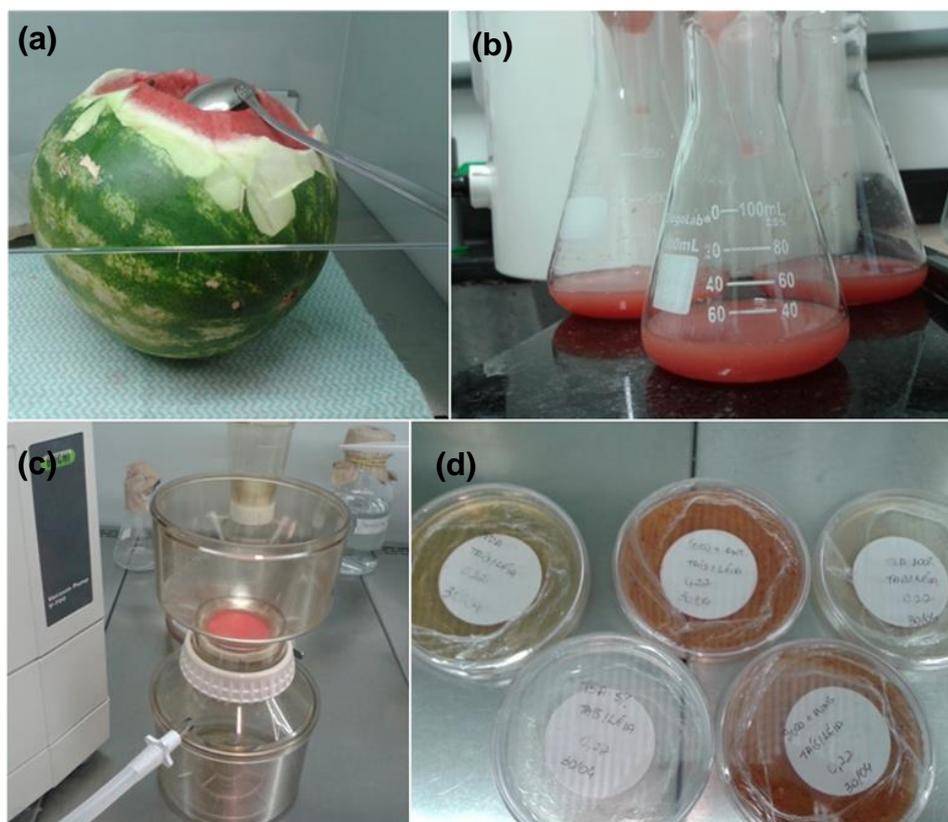


Figura 11 - Procedimentos realizados no isolamento por filtração em membrana: **(a)** descasque e retirada da polpa; **(b)** filtração do suco obtido; **(c)** filtração do suco em membrana; **(d)** placas inoculadas com as membranas.

3.2.2.2 Fruto em estágio avançado de maturação

3.2.2.2.1 Isolamentos

Nestes isolamentos foram utilizados frutos em estágio avançado de maturação, provenientes de lavoura comercial, do município de Formoso do Araguaia – TO. Os meios de cultura utilizados foram AGAR TSA – Triptona de soja (Himedia), preparado com o fungicida benomyl (50 µg/mL), YPDA (20 g de peptona, 10 g de extrato de levedura, 20 g de glicose e 15 g de ágar) e PDA (KASVI), adicionados do antibiótico rifampicina (100 µg/mL). Os isolamentos aconteceram em quatro etapas:

a) Primeira etapa

No mesmo dia da coleta, foi realizada a técnica de isolamento por trituração para obtenção do macerado, conforme Azevedo et al. (2014), plaqueando por espalhamento, em duplicata, 100 µL do macerado nos meios de cultura TSA 5% para

bactérias e YPDA e PDA para leveduras. As placas foram incubadas em B.O.D. a 28 °C por 48 – 72 horas.

b) Segunda etapa

O isolamento ocorreu dois dias após a coleta, com o fruto em estágio avançado de maturação mantido sob refrigeração. O isolamento foi realizado por trituração (suco) e por filtração em membrana conforme Mulvany (1969). A polpa foi batida em liquidificador para obtenção do suco e o volume de 20 mL (21,3 g) representou a primeira amostra, da qual se diluiu 100 µL em 900 µL de tampão PBS em 10^{-1} e 10^{-2} e 100 µL de cada diluição e do não diluído foram inoculados no meio TSA 5% para o isolamento de bactérias, incubando em B.O.D. a 28°C por 48 – 72 horas.

Para o isolamento por filtração em membrana um volume do suco foi filtrado em papel filtro, para a retirada do bagaço, e 15 mL deste volume foram filtrados em membrana de 0,22 µm (Merck Millipore). A membrana foi transferida para um frasco de Erlenmeyer com 5 mL de tampão PBS e incubada em shaker a 28 °C e agitação de 220 rpm por 2 horas. Posteriormente, 100 µL da amostra (tampão + membrana) foram plaqueados em cada um dos meios YPDA e PDA, para o isolamento de leveduras. O plaqueamento foi realizado em triplicata e as placas foram incubadas em B.O.D. a 28°C por 48 – 96 horas.

c) Terceira etapa

O isolamento foi realizado com um volume maior, após sete dias da coleta dos frutos. A polpa foi processada, o suco obtido e filtrado em papel filtro para procedimento da filtração em membrana. Foram filtrados dois volumes de suco, 17 mL e 35 mL, em membrana de 0,22 µm (Merck Millipore) e as membranas obtidas foram transferidas para Erlenmeyer com tampão PBS e antibiótico rifampicina (50 µg/mL). A membrana resultante da filtração de 17 mL de suco foi transferida para um Erlenmeyer com 5 mL de tampão e a membrana da filtração de 35 mL, para Erlenmeyer com 10 mL de tampão (Figura 12). Ambas foram incubadas em shaker a 28 °C e agitação de 200 rpm e após 50 minutos de incubação, 100 µL da amostra com a membrana da filtração de 35 mL foram plaqueados, em triplicata, no meio TSA 5% para o isolamento de bactérias e incubadas em B.O.D. a 28 °C por 24 – 72 horas.

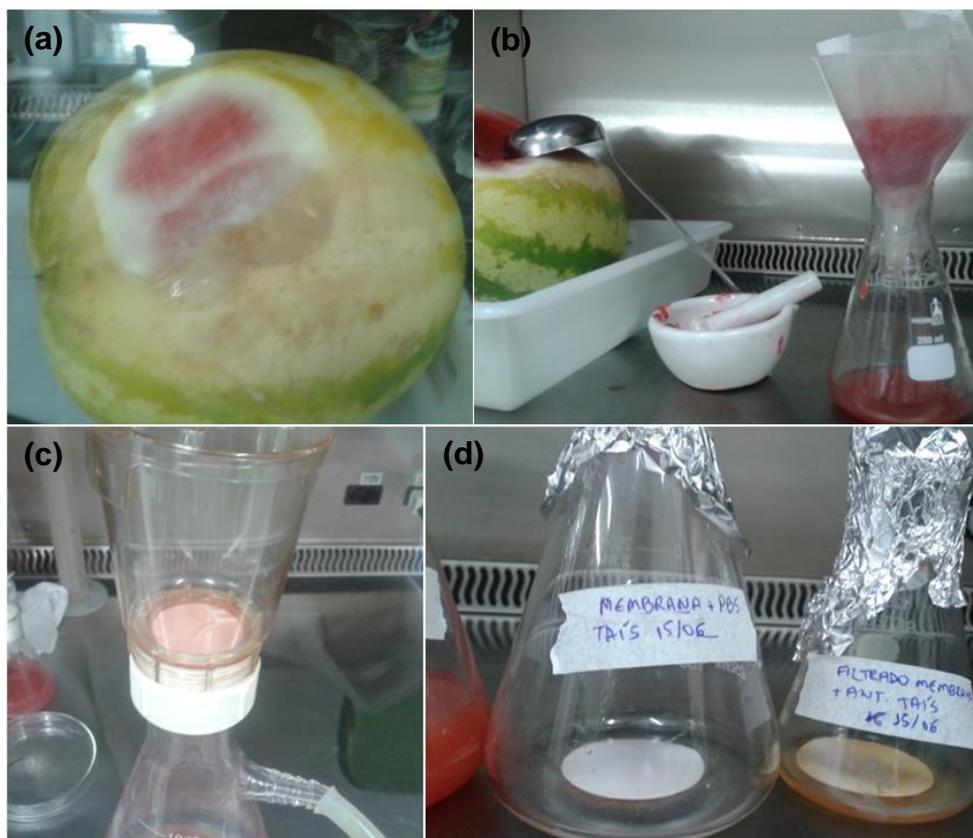


Figura 12 - Etapas do isolamento com fruto passado: **(a)** fruto descascado; **(b)** filtração do suco em papel filtro; **(c)** filtração do suco em membrana; **(d)** inoculação da membrana em tampão PBS.

Para o isolamento de leveduras, após 16 e 42 horas de incubação sob agitação alíquotas de 100 μ L de ambas as amostras com as membranas foram plaqueadas nos meios YPDA e PDA, em duplicata, e incubadas em B.O.D. a 28°C por 24 – 96 horas.

d) Quarta etapa

Por fim, foi realizado o isolamento por filtração em membrana após 14 dias da coleta dos frutos. Do suco obtido e filtrado em papel filtro, 30 mL e 75 mL foram filtrados em membranas de 0,22 μ m (Merck Millipore). As membranas foram então colocadas em Erlenmeyer com 5 mL de tampão PBS e incubadas em shaker a 28 °C e agitação a 235 rpm por 3 horas. Após este tempo, 100 μ L de cada amostra foram plaqueados, em triplicata, nos meios TSA 5%, YPDA e PDA, para isolamento de bactérias e leveduras, incubado-as em B.O.D. a 27 °C.

O restante do suco filtrado em papel filtro foi acondicionado em Erlenmeyer e incubado sob refrigeração (4 °C) durante 7 dias e 14 dias, nos quais foram realizados novos isolamentos. Para cada isolamento de leveduras, 100 µL do suco com 7 e 14 dias de incubação foram plaqueados, em triplicata, nos meios YPDA e PDA. Para o isolamento de bactérias realizou-se a diluição seriada das amostras em tampão PBS até 10^{-3} , inoculando 100 µL de cada amostra, em triplicata, no meio TSA 5%. As placas foram incubadas em B.O.D. a 27°C.

3.3 Preservação de bactérias e leveduras

O estoque de bactérias e leveduras, endofíticas e associadas, isoladas das folhas e frutos de melancia foi realizado denominando com uma codificação para cada microrganismo que seguiu uma ordem crescente. As colônias isoladas foram selecionadas, buscando características distintas como textura, tamanho e coloração. Em seguida, realizou-se a purificação dessas colônias para preservação por ultracongelamento, seguindo as metodologias de Martins et al. (2014).

Primeiramente, foi efetuada a purificação de cada colônia, tanto de bactéria como de levedura, por meio da técnica de estria por esgotamento, em que as bactérias foram estriadas no meio de cultura TSA 25% e as leveduras no meio YPDA, incubando-as em estufa a 28 °C por 48 – 72 horas. Com a obtenção da colônia isolada e pura, uma colônia de bactéria foi inoculada em meio líquido TSB (Kasvi) 100% e uma colônia de levedura em YPD (Difco). A cultura foi incubada, durante 16 a 18h sob agitação a 28 °C sob agitação (200 rpm). Posteriormente, 900 µL do meio contendo o microrganismo crescido foram suplementados com 900 µL de glicerol 60% esterilizado, em criotubos devidamente identificados, os quais foram armazenados em ultrafreezer (-80 °C).

3.4 Caracterização molecular de bactérias e leveduras associadas a frutos e folhas de melancia

3.4.1 Extração de ácidos nucleicos

A extração de ácidos nucleicos das leveduras endofíticas e associadas e das bactérias (que não amplificaram a região 16S por meio da técnica PCR *colony*), foi realizada com os kits: Gentra Puregene Yeast/Bact. Kit (Qiagen) e Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (PROMEGA), de acordo com manual do fabricante, com algumas modificações.

Em relação às bactérias, fez-se a extração de DNA utilizando apenas o protocolo para bactérias gram-negativas, consistindo em: primeiramente duas incubações, uma a 80 °C por 10 min e outra a 37 °C por 1h, para lise das células. Em seguida, realizou-se a separação das fases por meio da centrifugação a 14000 rpm por 30 min e a precipitação do DNA em isopropanol, fazendo a mistura por inversão e centrifugando-a a 14000 rpm por 15 min. O DNA então foi lavado com etanol 70%, seco em concentrador a vácuo (LABCONCO) e ressuspendido em água ultrapura estéril.

Para as leveduras, a extração com o kit da PROMEGA utilizou a lyticase (Sigma L4025) e o kit Qiagen a sua própria solução de enzima lítica, havendo em ambos uma primeira incubação a 37 °C por 1h, e uma segunda nessas mesmas condições com a RNase. O sobrenadante contendo o DNA foi limpo, por meio da centrifugação a 14000 rpm por 30 minutos e precipitado em isopropanol, realizando a mistura por inversão e centrifugando-a a 14000 rpm por 15 min. Por fim, o DNA foi lavado com etanol 70%, seco e ressuspendido em água da mesma forma que as bactérias.

Posterior à extração, o material genético de bactérias e leveduras foi quantificado com auxílio de espectrofotômetro (Nanodrop ND-1000 – Thermo Scientific), no qual se avaliou a pureza das amostras tomando como valores de referências as razões de absorbância 260nm/280nm entre 1,8 e 2,0.

3.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase – PCR

Para bactérias, realizou-se o procedimento de PCR *colony*, pela qual não é necessário extrair seu DNA genômico. Inicialmente, as bactérias foram cultivadas por esgotamento em estrias em meio de cultura TSA 25% (28 °C, 18-24 horas) até o surgimento de colônias isoladas e puras. Com auxílio de palito esterilizado, uma colônia foi coletada e transferida para microtubo de 1,5 ou 2,0 mL contendo 200 µL de água ultrapura esterilizada. O microtubo foi homogeneizado em vórtex por 5 min e em seguida incubado a 99 °C por 5 min. Uma alíquota de 1 µL desta suspensão foi utilizada como molde na reação de PCR. Os isolados de bactérias para os quais não houve amplificação com a utilização da estratégia de PCR *colony* foram submetidos à extração de ácidos nucléicos conforme descrito anteriormente.

A amplificação da região 16S do DNA ribossômico de bactérias foi realizada com os oligonucleotídeos universais P027F (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e R1378 (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-3'), aproximadamente 1500 pb (LANE, 1991) em uma reação de 50 µL, contendo: tampão 1X (PROMEGA; Phoneutria) ; 2,5 mM de MgCl₂ (PROMEGA; Phoneutria); 0,2 mM de dNTPs; 0,2 µM de cada oligonucleotídeos; 1,5 U de Taq polimerase (PROMEGA; Phoneutria) e 1 µL do DNA genômico. A reação de amplificação ocorreu em termociclador (Applied Biosystems Veriti™) com a programação: desnaturação inicial a 94 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos, consistindo em desnaturação a 95 °C por 30 seg, anelamento a 63 °C por 1 min e 30 seg e extensão de 72 °C por 1 min e 30 seg, finalizando com a extensão final a 72 °C por 10 min.

Para leveduras, a amplificação da região D1/D2 do DNA ribossômico 26S foi efetuada com os oligonucleotídeos NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGAC GG -3'), aproximadamente 600 pb, em reações de 50 µL contendo: tampão 1X (PROMEGA; Phoneutria); 3,7 mM de MgCl₂ (PROMEGA; Phoneutria); 0,2 mM de dNTP's; 0,8 µM de cada oligonucleotídeos; 1,5 U de Taq polimerase (PROMEGA; Phoneutria) e 1 µL (10 a 20 ng) do DNA genômico. Esta se deu em termociclador (Applied Biosystems Veriti™) com desnaturação inicial a 94 °C por 1 min seguida de 36 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 52 °C por 1 minuto, extensão a 72 °C por 2 minutos e extensão final a 72 °C por 10 minutos (KURTZMAN; ROBNETT, 1998).

Após a amplificação, os produtos de PCR foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose (1%) em tampão TAE 1X, corado com solução de brometo de etídio conforme metodologia de Martins et al. (2014), aplicando-se a mistura de 5 µL de produtos de PCR com 5 µL de tampão de corrida (Loading Buffer) 1X e 3 µL do marcador gene Ruler 1kb Ladder (Thermo Fisher Scientific), sendo ao final visualizadas em fotodocumentador de gel com transiluminador L-Pix Chemi (Loccus Biotecnologia).

3.4.3 Purificação de produtos de PCR e sequenciamento

Os produtos de amplificação do DNA genômico de bactérias e leveduras foram purificados utilizando Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (PROMEGA), sendo que ao final, os produtos foram eluídos em água ultrapura estéril e armazenados em freezer a -20°C. Os purificados foram quantificados com auxílio de espectrofotômetro e avaliados em gel de agarose (2%) com o marcador Low DNA Mass Ladder (Invitrogen), aplicando-se 2 µL de marcador e 1 µL de amostra com 5 µL de tampão de corrida, cada. Por fim, foram visualizadas em fotodocumentador de gel com transiluminador.

As amostras foram enviadas para sequenciamento em empresa terceirizada pelo método de Sanger, ACTGene Análises Moleculares LTDA, Alvorada – RS, para ambas as fitas com os oligonucleotídeos R1378 e P027F para bactérias, e NL-1 e NL-4 para leveduras.

3.4.4 Análise das sequências e análise filogenética

As sequências de 16S (bactérias) e 26S (leveduras) foram analisadas com o auxílio do *software* Geneious 10.1.3. (KEARSE et al., 2012) para análise de qualidade e obtenção da sequência consenso (contig). As sequências foram cortadas uma a uma, excluindo os iniciais e finais com picos irregulares e a união das sequências *forward* e *reverse* formaram a sequência consenso. Em seguida, as sequências de boa qualidade foram submetidas à análise do tipo BLASTn com bases de dados do GenBank¹,

¹https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=b_lashome

Ribosomal Database Project (RDP)² e Mycobank³, sendo este último usado apenas para leveduras (Figura 13).

Para confirmar a identificação e obter maior acurácia na classificação taxonômica, realizou-se a análise filogenética com a construção de *datasets* para cada gênero incluindo as sequências de linhagens tipo (*type strain*) disponíveis em banco de dados. A árvore filogenética foi construída pelo programa MEGA 7.0.21 (TAMURA et al. 2016), realizando, primeiramente, o alinhamento pela função *ClustalW*, utilizando o método *Neighbor-Joining*, o teste de máxima verossimilhança composta (*Maximum Composite Likelihood*) e número de replicações bootstrap de 1000 (Figura 13).

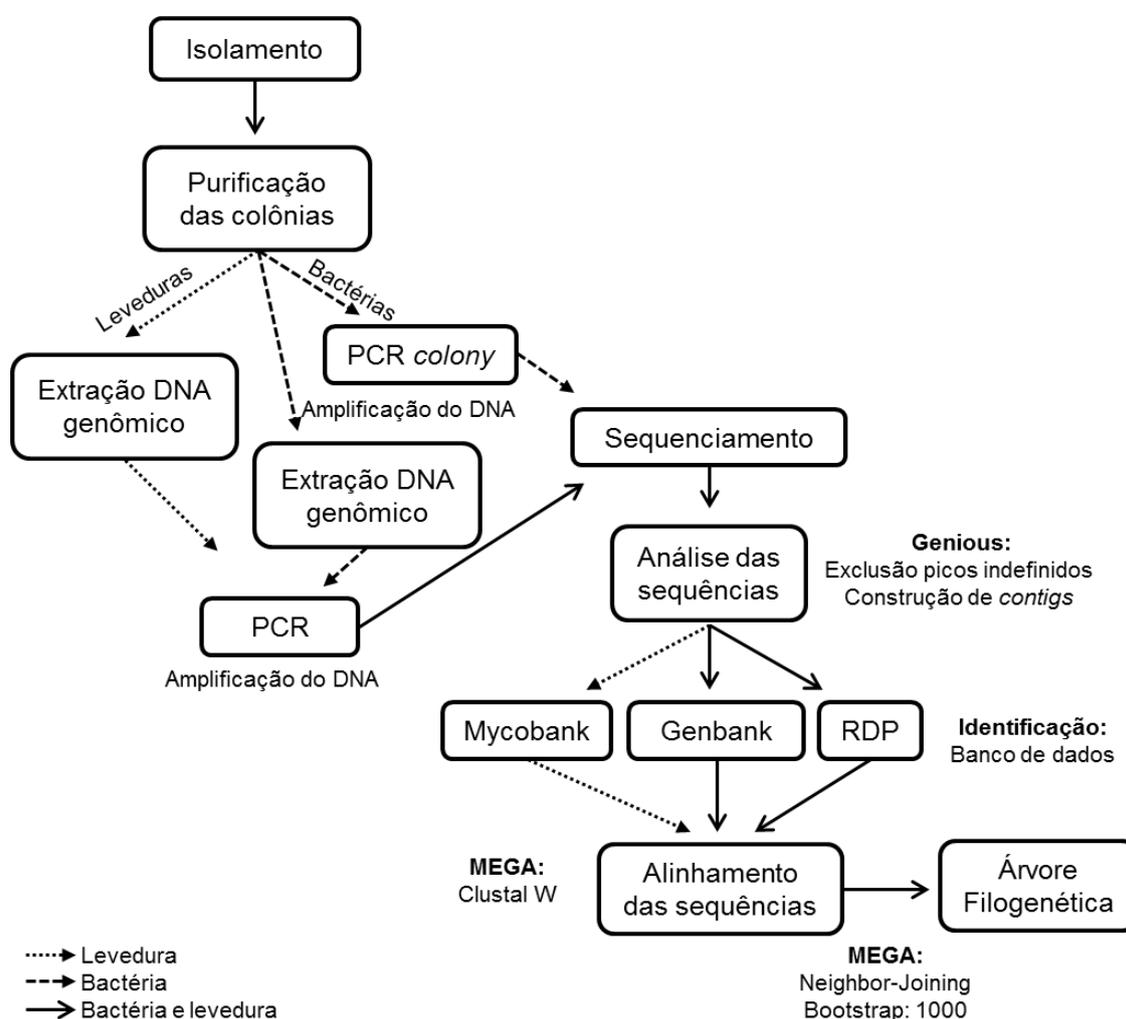


Figura 13 - Esquema representativo da análise de sequenciamento e análise filogenética dos isolados de bactérias e leveduras.

²http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp

³<http://www.mycobank.org/BioMICSSequences.aspx?expandparm=f&file=ALL>

3.5 Teste de antagonismo contra fungos fitopatogênicos

O teste de antagonismo foi realizado com os isolados de leveduras endofíticas e associadas obtidas de folhas e frutos de melancia: *Saccharomyces cerevisiae* (TAIL 04), *Pseudozyma antarctica* (TAIL 63), *Sporidiobolus pararoseus* (TAIL 66) e *Hannaella sinensis* (TAIL 95). Os fungos fitopatogênicos avaliados foram: *Sclerotinia sclerotium* sp., *Alternaria* sp., *Pyricularia oryzae*, *Curvularia lunata*, *Didymella* sp., *Fusarium* sp., *Macrophomina* sp. e *Rhizoctonia solani*. Os fungos utilizados foram cedidos pelo laboratório de Manejo Integrado de Pragas e de Fitopatologia do campus de Gurupi – UFT. Estes fungos são fitopatógenos de variadas culturas.

O efeito sobre o crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos pelas leveduras foi avaliado de acordo com Matic et al. (2015), em que uma estria da levedura foi pareada com um disco (8 mm) em uma placa de Petri (90x15 mm) com meio de cultura BDA (Kasvi). As leveduras foram crescidas por 2 dias no meio de cultura NYDA (8 g/L de caldo nutriente, 5 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de glicose e 15 g/L de ágar) e os fungos por 5 dias em meio PDA, ambos a 25 °C.

Para o ensaio de dupla cultura, uma alçada da levedura foi estriada a 30 mm da borda da placa e o disco do fungo foi colocado centralizado a 26 mm da borda oposta e a 26 mm da estria da levedura, em triplicata para cada dupla cultura, e as placas foram incubadas a 25°C por 10 dias. O crescimento micelial foi medido diariamente com o auxílio de um paquímetro e a inibição do crescimento fúngico foi calculada pelo percentual de inibição do crescimento radial PIRG de acordo com a fórmula:

$$\text{PIRG} = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100$$

em que R1 corresponde ao crescimento radial do fungo em direção à placa, e R2 ao crescimento radial do fungo em direção ao antagonista (FOKKEMA, 1976).

3.6 Produção de ácido indolacético por isolados de leveduras endofíticas e associadas

A determinação da produção de ácido indolacético (AIA) foi realizada para os isolados de leveduras *S. cerevisiae* (TAIL 04), *P. antarctica* (TAIL 63), *S.*

pararoseus (TAIL 66) e *H. sinensis* (TAIL 95) seguindo a metodologia de Limtmong et al. (2014), com modificações. As leveduras foram crescidas em meio YMA (3 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de extrato de malte, 5 g/L de peptona, 10 g/L de glicose e 15 g/L de ágar), por 2 dias a 25 °C, inoculadas em tubos com 5 mL de meio YPD (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona e 20 g/L de dextrose) suplementado com 1 g/L de L-triptofano e incubadas em shaker a 30 °C±2 °C, agitação de 150 rpm por 7 dias. Uma alíquota de 1,5 mL do inóculo foi centrifugado a 8000 rpm por 5 min e 500 µL do sobrenadante foi misturado com 500 µL do reagente Salkowski (12 g/L FeCl₃ e 7,9 M H₂SO₄) (GLICKMANN; DESSAUX, 1995). Em seguida, esta mistura foi incubada na ausência de luz por 30 min e, posteriormente, realizou-se a leitura em espectrofotômetro digital (Edutec) no comprimento de onda de 530 nm. A curva de calibração foi realizada com AIA comercial (Dinâmica) com as seguintes concentrações: 2, 4, 6, 8, 10, 20 e 40 µg/mL, para estimar a concentração de AIA, por meio da equação reta obtida.

3.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada por meio do programa Assistat versão 7.7 (SILVA; AZEVEDO, 2016) para os resultados obtidos no antagonismo e na produção de AIA, pelo delineamento inteiramente casualizado, com três e quatro repetições, respectivamente, aplicando a análise de variância (ANOVA) com o teste Tukey a 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento de bactérias e leveduras endofíticas e associadas de folhas e frutos de melancia

Foi obtido um total de 620 isolados de microrganismos endofíticos e associadas provenientes de diferentes procedimentos aplicados nas folhas e frutos de melancia, consistindo em 380 bactérias e 240 leveduras (Tabela 4). Os isolados foram classificados como endofíticos aqueles de folhas tratadas com a condição 4 e associados os tratados com as outras condições (condição 1, 2 e 3), nas quais ocorreu a desinfestação mas não foi 100% eficaz permanecendo alguns microrganismos na superfície da folha. Todos os isolados do fruto de melancia foram considerados endofíticos. Houve o crescimento de fungos nos experimentos com fragmentos de folha e com o fruto em estágio de maturação avançada, porém não foram contabilizados e analisados neste estudo.

Tabela 4 - Número de isolados de bactérias e leveduras obtidos de diferentes procedimentos aplicados para folhas e frutos de melancia provenientes do comércio de Brasília – DF e de lavouras comerciais de Formoso do Araguaia – TO.

Tecidos	Procedimentos	Número de isolados				Total
		Bactérias		Leveduras		
		Endofíticas	Associadas	Endofíticas	Associadas	
Folha	Fragmento	42	137	55	96	330
	Macerado	51	24	35	27	137
Fruto	Membrana	36	-	4	-	40
	Enriquecimento	71	-	23	-	94
	Macerado	19	-	0	-	19
Total		219	161	117	123	620

(-) não foram isolados microrganismos.

O maior número de isolados foi obtido do tecido foliar de melancia com o total de 467, por agregar microrganismos associados e endofíticos residentes do filoplano e endosfera. Já o isolamento realizado no fruto, com 153 isolados, obteve apenas endofíticos, isolados da sua parte interna (mesocarpo). Conforme observado por Turner et al. (2013) o microbioma de uma mesma planta associada a tecidos da

superfície, da parte interna e abaixo da terra, podem diferir em números e espécies, devido às capacidades metabólicas requeridas em cada local.

Neste contexto, Compant et al. (2011) analisaram endofíticos presentes na rizosfera, endoriza, haste de ramificação, polpa e semente da uva, no estágio de colheita de um vinhedo da Austrália, e também encontraram um menor número de isolados nas polpas ($2.87 \pm 2.2 \log_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$) quando comparado a rizosfera ($7.73 \pm 0.4 \log_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$), endoriza ($5.92 \pm 1.43 \log_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$) e haste de ramificação ($3.69 \pm 0.1 \log_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$).

O isolamento de folhas pelo procedimento macerado obteve um número menor de isolados (137) em relação ao isolamento por fragmentação com 330 isolados (Tabela 4). Esses resultados diferenciam de Araújo et al. (2001) que detectou maior número de isolados endofíticos em placas com folhas maceradas do que nas placas com fragmentos de folhas em cultivares de citrus, mas pode ser justificado pela quantidade de amostras ter sido maior para o isolamento por fragmentação quando comparado ao isolamento com o macerado.

Dos isolamentos com o fruto, a amostra enriquecida foi a que obteve maior número de isolados com 71 bactérias e 23 leveduras, seguido do isolamento por filtração em membrana com 36 bactérias e 4 leveduras (Tabela 4). No presente trabalho o enriquecimento proporcionou condições similares ao habitat natural dos microrganismos, favorecendo seu desenvolvimento e o uso da membrana concentrou na superfície do filtro um número de microrganismos presentes no volume líquido (MULVANY, 1969; BOUNDY-MILLS, 2006). Khalaf; Raizada (2015) isolaram bactérias endofíticas de *Citrullus lanatus* e também apresentou baixa frequência em sementes de frutas frescas de melancia.

No geral, as leveduras foram isoladas em menor quantidade do que as bactérias (Tabela 4), o que pode estar relacionado ao uso de compostos químicos no cultivo convencional, principalmente fungicidas, que reduzem a população de leveduras e fungos endofíticos (CAMATTI-SARTORI et al., 2005).

4.1.1 Isolamento por fragmentação de folhas de melancia

O primeiro isolamento por fragmentação de folhas de melancia serviu como teste para determinar a condição de desinfestação superficial, pois os tempos de

tratamentos aplicados neste experimento não foram suficientes para esterilizar a superfície da folha, visto que o plaqueamento da água da última lavagem resultou no crescimento de bactérias no meio TSA 5%, com mais de 200 colônias na condição 1, 57 colônias na condição 2 e 5 colônias na condição 3 (Figura 14). No segundo isolamento, aplicaram-se duas condições de desinfestação superficial denominadas condição 3 e 4, sendo esta última a mais eficiente na esterilização superficial de folhas de melancia, em que não houve crescimento microbiano, ou seja, foi igual a zero (Figura 14b).

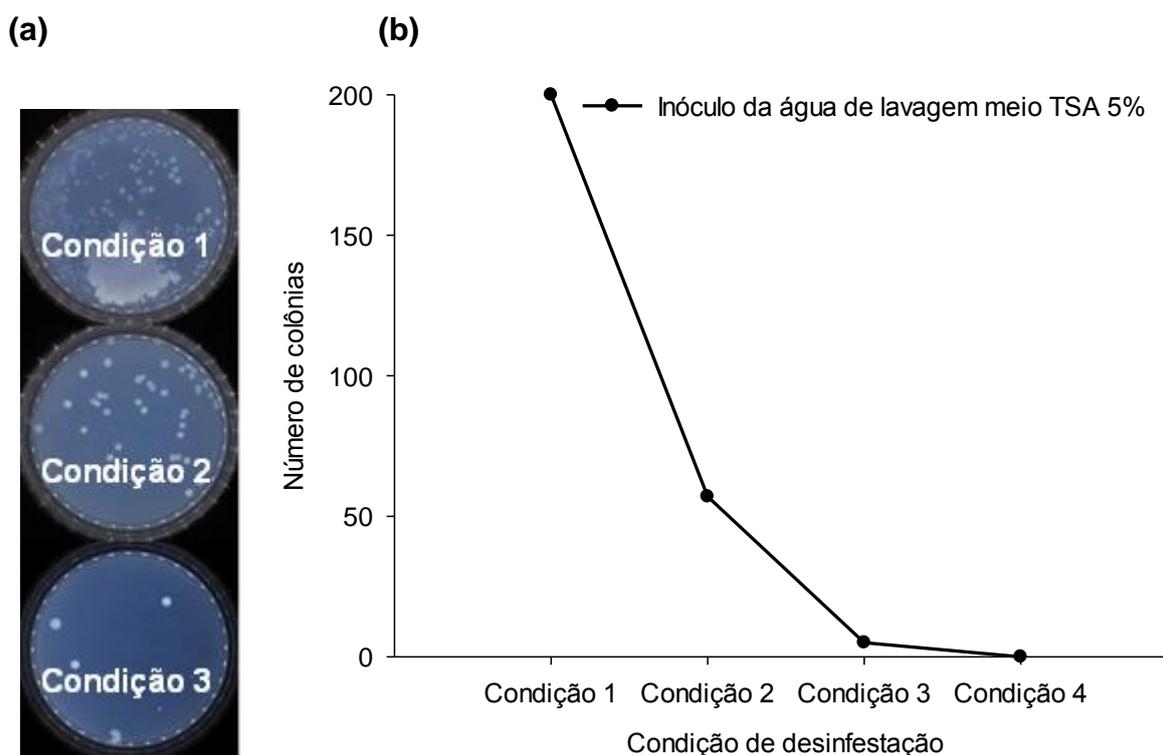


Figura 14 - Eficiência das condições de desinfestação superficial comprovada pelo inóculo da água de lavagem (a) placas com crescimento de microrganismo; (b) redução do número de colônias nos tempos de desinfestação.

4.1.1.2. Frequência de isolamento de endofíticos

A frequência de isolamento foi calculada apenas para as placas com os fragmentos tratados com a condição 4. O número de fragmentos analisados na condição 4 foi de 168, distribuídos em oito placas replicadas com os meios YPDA e PDA para o isolamento de leveduras e fungos e o meio TSA 5% para o isolamento de bactérias, contendo 7 fragmentos cada.

Os fragmentos com crescimento microbiano de bactérias e leveduras foram contabilizados aos 3, 5 e 7 dias de incubação das placas TSA 5%, YPDA e PDA, respectivamente. Pode ser observado na figura 15 as placas com fragmentos com crescimento microbiano em cada meio de cultura ao final de 7 dias.

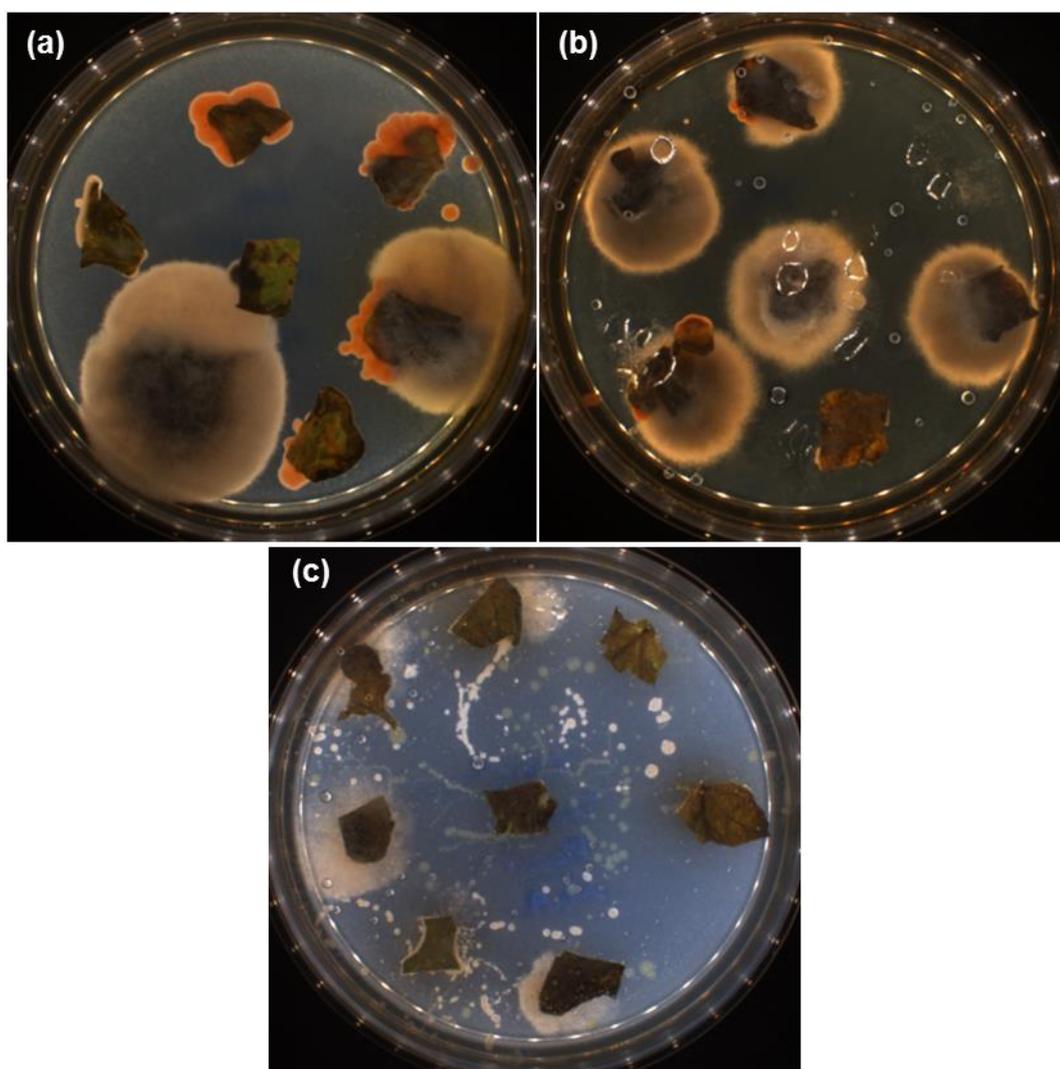


Figura 15 - Fragmentos de folha de melancia com crescimento microbiano nos meios **(a)** PDA, **(b)** YPDA e **(c)** TSA 5%.

A frequência de isolamento foi calculada na contagem de fragmentos com crescimento microbiano de leveduras nos meios YPDA e PDA e de bactérias no meio TSA 5%, aos 7 dias de incubação, com o total de 56 fragmentos por meio de cultura (Tabela 5).

Tabela 5 - Percentual de frequência de isolamento de leveduras e bactérias endofíticas de folhas de melancia ao final de sete dias de incubação.

		Nº de Fragmentos		
		C/ crescimento	Totais	FI (%)
Leveduras	YPDA	22	56	39,29
	PDA	28	56	50
Bactérias	TSA 5%	49	56	87,5

FI: Frequência de isolamento.

As frequências de isolamento obtidas para os endofíticos foram de 89,29% para leveduras e 87,5% para bactérias. As bactérias foram isoladas no meio TSA 5% enquanto que as leveduras foram isoladas nos meios YPDA e PDA, obtendo o percentual de 39,29% no meio YPDA e de 50% no meio PDA, indicando que as espécies de leveduras isoladas neste trabalho crescem melhor em meio de cultura neutro (PDA).

Em outras espécies de plantas, Gai et al. (2009) isolaram leveduras endofíticas de folhas de laranja doce (*Citrus sinensis*) das áreas de Catanduva, Colina, Elisiário e Novais (São Paulo) e também encontraram alta frequência de isolamento de leveduras de 80,9% e 85,6% em folhas não infectadas de laranja e de tangerina, respectivamente. Similarmente, Araújo et al. (2002) encontraram alta frequência (75%) de bactérias em ramos de laranja doce (*C. sinensis* Osbeck cv. Natal) saudáveis coletadas de áreas de plantações de citrus do estado de São Paulo e Minas Gerais.

4.2 Identificação dos microrganismos de folhas e frutos de melancia

Os microrganismos isolados de melancia consistiram em bactérias e leveduras endofíticas e associadas obtidas de folhas e frutos de melancia.

4.2.1 Bactérias

Considerando as características macroscópicas das colônias como tamanho, coloração e aspecto, a amostra analisada, procedimento de isolamento e condição de desinfestação superficial das folhas foram selecionados 228 isolados para o estudo da diversidade de bactérias endofíticas e associadas da melancia (Figura 16a). Dessas, aplicou-se a técnica de PCR *colony* em 66 isolados e 162 isolados tiveram seu DNA genômico extraído, obtendo o total de 139 isolados com produtos de amplificação via a

PCR com os oligonucleotídeos P027F e R1378 da região 16S (de aproximadamente 1500 pb) (Figura 16b).

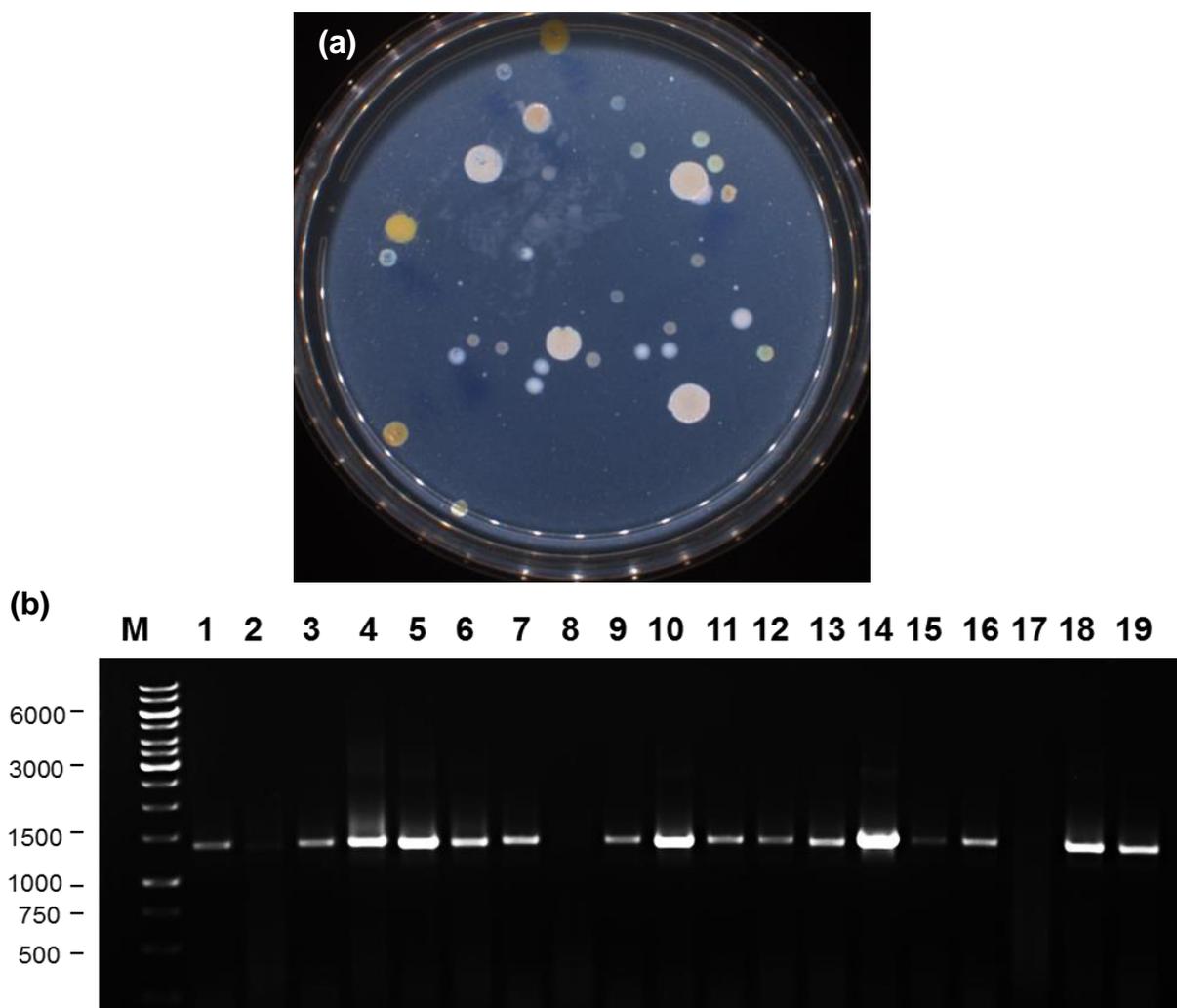


Figura 16 - (a) Diversidade de colônias de bactérias em placa TSA 5% de isolamento; **(b)** Produtos de amplificação da região 16S do DNA ribossômico de bactérias endofíticas e associadas obtidas de folhas e frutos de melancia.

M marcador Ruler 1kb Ladder (Thermo Fisher Scientific) **1.** TAIB 636A, **2.** 671, **3.** 641, **4.** 680, **5.** 627, **6.** 673A, **7.** 523A, **8.** 538A, **9.** 630B, **10.** 638, **11.** 527A, **12.** 639B, **13.** 646A, **14.** 542D, **15.** 539A, **16.** 543A, **17.** 658, **18.** 642, **19.** 542A (gel de agarose 1%).

Pela purificação dos produtos de PCR, 116 isolados foram preparados e enviados para sequenciamento, das quais 71 sequências apresentaram qualidade para a análise. As sequências foram comparadas com sequências disponíveis nas bases de dados Genbank e RDP para estimativa da classificação taxonômica (Tabela 6). Os isolados identificados pertenceram às folhas e frutos em estágio de maturação avançado, estes caracterizados como refugos, aqueles que não podem ser comercializados como fruta fresca, possibilitando o seu uso na biotecnologia.

Tabela 6 - Identificação das sequências de isolados de bactérias endofíticas e associadas a folhas e frutos de melancia por meio da região 16S do DNA ribossômico.

Isolado	Pb	Origem	Percentual de identidade	
			Genbank	RPD
TAIB433	747	Fruto	98% <i>Enterobacter ludwigii</i> (KY218819.1)	98,8% <i>Enterobacter ludwigii</i> (S004217927)
TAIB434	715	Fruto	99% <i>Burkholderia cepacia</i> (KY681449.1)	100% <i>Burkholderia cepacia</i> (S000011912)
TAIB440	655	Fruto	99% <i>Burkholderia cepacia</i> (KY681449.1)	100% <i>Burkholderia cepacia</i> (S000011912)
TAIB445	596	Fruto	99% <i>Pantoea septica</i> (NR_116752.1)	97,1% <i>Pantoea septica</i> (S001187641)
TAIB453	728	Fruto	99% <i>Pantoea septica</i> (NR_116752.1)	97,9% <i>Pantoea septica</i> (S001187641)
TAIB458	660	Fruto	99% <i>Pantoea vagans</i> (KF986850.1)	98,8% <i>Pantoea vagans</i> (S004061673)
TAIB484	1290	Fruto	99% <i>Pantoea septica</i> (NR_116752.1)	98,3% <i>Pantoea septica</i> (S001187641)
TAIB494	716	Fruto	99% <i>Pantoea allii</i> (NR_115258.1)	99% <i>Pantoea allii</i> (S000412194)
TAIB496	674	Fruto	99% <i>Pantoea allii</i> (NR_115258.1)	99% <i>Pantoea allii</i> (S000412194)
TAIB497	1208	Fruto	99% <i>Pantoea agglomerans</i> (EU272867.1)	99% <i>Pantoea agglomerans</i> (S000493794)
TAIB498	762	Fruto	99% <i>Pantoea allii</i> (NR_115258.1)	99% <i>Pantoea allii</i> (S000412194)
TAIB500	715	Fruto	99% <i>Pantoea vagans</i> (KF986850.1)	99% <i>Pantoea allii</i> (S000412194)
TAIB501	735	Fruto	99% <i>Pantoea allii</i> (NR_115258.1)	99% <i>Pantoea allii</i> (S000412194)
TAIB524	1192	Folha	99% <i>Pseudomonas fluorescens</i> (KY643713.1)	100% <i>Pseudomonas fluorescens</i> (S000588181)
TAIB552	675	Folha	97% <i>Pantoea dispersa</i> (KX179628.1)	98,5% <i>Pantoea dispersa</i> (S000925452)
TAIB553	1182	Folha	99% <i>Pantoea dispersa</i> (KX179628.1)	100% <i>Pantoea dispersa</i> (S000925452)
TAIB554	1173	Folha	99% <i>Pantoea dispersa</i> (KX179628.1)	99,5% <i>Pantoea dispersa</i> (S000925452)
TAIB555	1239	Folha	99% <i>Pantoea dispersa</i> (KX179628.1)	99% <i>Pantoea dispersa</i> (S000925452)

continua

Continuação

Isolado	Pb	Origem	Percentual de identidade	
			Genbank	RPD
TAIB556	669	Folha	97% <i>Pantoea dispersa</i> (KX179628.1)	98,3% <i>Pantoea dispersa</i> (S000925452)
TAIB557	1195	Folha	98% <i>Pantoea dispersa</i> (KX179628.1)	100% <i>Pantoea dispersa</i> (S000925452)
TAIB559	1230	Folha	99% <i>Pantoea dispersa</i> (KX179628.1)	100% <i>Pantoea dispersa</i> (S000925452)
TAIB560	1162	Folha	99% <i>Curtobacterium citreum</i> (AB506119.1)	100% <i>Curtobacterium citreum</i> (S001574826)
TAIB561	1193	Folha	99% <i>Pantoea dispersa</i> (KX179628.1)	100% <i>Pantoea dispersa</i> (S000925452)
TAIB566	770	Folha	99% <i>Sphingomonas melonis</i> (HE716911.1)	97,6% <i>Sphingomonas melonis</i> (S001874696)
TAIB568	724	Folha	99% <i>Sphingomonas melonis</i> (HE716911.1)	98,9% <i>Sphingomonas melonis</i> (S001874696)
TAIB569	577	Folha	98% <i>Pantoea dispersa</i> (KX179628.1)	100% <i>Pantoea dispersa</i> (S000925452)
TAIB575	1176	Folha	98% <i>Pantoea dispersa</i> (KX179628.1)	100% <i>Pantoea dispersa</i> (S000925452)
TAIB576	815	Folha	99% <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (KY849353.1)	100% <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (S000129670)
TAIB579	538	Folha	99% <i>Curtobacterium citreum</i> (AB506119.1)	98,6% <i>Curtobacterium citreum</i> (S001574826)
TAIB583	1213	Folha	99% <i>Pantoea dispersa</i> (KX179628.1)	100% <i>Pantoea dispersa</i> (S000925452)
TAIB585	1174	Folha	98% <i>Microbacterium testaceum</i> (HM449703.1)	99,4% <i>Microbacterium testaceum</i> (S001291867)
TAIB594	615	Folha	95% <i>Curtobacterium citreum</i> (AB506119.1)	100% <i>Curtobacterium citreum</i> (S001574826)
TAIB595	718	Folha	96% <i>Pantoea dispersa</i> (KX179628.1)	99,2% <i>Pantoea dispersa</i> (S000925452)
TAIB596	552	Folha	98% <i>Microbacterium testaceum</i> (HM449703.1)	99,4% <i>Microbacterium testaceum</i> (S001291867)
TAIB600	1229	Folha	99% <i>Curtobacterium oceanosedimentum</i> (NR_104839.1)	100% <i>Curtobacterium citreum</i> (S001574826)
TAIB604	1206	Folha	99% <i>Pantoea dispersa</i> (KX179628.1)	99,4% <i>Pantoea dispersa</i> (S000925452)
TAIB623	739	Folha	99% <i>Williamsia serinedens</i> (FN673550.1)	100% <i>Williamsia serinedens</i> (S000711434)

continua

Continuação

Isolado	Pb	Origem	Percentual de identidade	
			Genbank	RPD
TAIB626	710	Folha	97% <i>Bacillus pumilus</i> (KC692204.1)	98,4% <i>Bacillus pumilus</i> (S000481068)
TAIB630A	1203	Folha	99% <i>Bacillus pumilus</i> (KC692204.1)	100% <i>Bacillus pumilus</i> (S000481068)
TAIB633A	1190	Folha	99% <i>Bacillus safensis</i> (KY820044.1)	100% <i>Bacillus safensis</i> (S000458519)
TAIB634	1214	Folha	99% <i>Pantoea dispersa</i> (KX179628.1)	99% <i>Pantoea dispersa</i> (S000925452)
TAIB635A	1195	Folha	98% <i>Pantoea dispersa</i> (KX179628.1)	100% <i>Pantoea dispersa</i> (S000925452)
TAIB636A	685	Folha	96% <i>Pantoea dispersa</i> (KX179628.1)	98,2% <i>Pantoea dispersa</i> (S000925452)
TAIB639A	1219	Folha	98% <i>Pantoea dispersa</i> (KX179628.1)	99,8% <i>Pantoea dispersa</i> (S000925452)
TAIB643A	570	Folha	97% <i>Pantoea dispersa</i> (KX179628.1)	100% <i>Pantoea dispersa</i> (S000925452)
TAIB644	1173	Folha	99% <i>Pantoea dispersa</i> (KX179628.1)	100% <i>Pantoea dispersa</i> (S000925452)
TAIB645	1184	Folha	99% <i>Bacillus altitudinis</i> (KY818981.1)	100% <i>Bacillus pumilus</i> (S000481068)
TAIB649A	1191	Folha	99% <i>Pseudomonas cf. synxantha</i> (AJ244725.1)	100% <i>Pseudomonas cf. synxantha</i> (S000094249)
TAIB651	763	Folha	99% <i>Pantoea dispersa</i> (KX179628.1)	100% <i>Pantoea dispersa</i> (S000925452)
TAIB654	685	Folha	99% <i>Bacillus pumilus</i> (KC692204.1)	98,6% <i>Bacillus safensis</i> (S000458519)
TAIB656A	719	Folha	99% <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (KP241047.1)	99,9% <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (S000129670)
TAIB657	781	Folha	99% <i>Pantoea dispersa</i> (KX179628.1)	100% <i>Pantoea dispersa</i> (S000925452)
TAIB661	1282	Folha	99% <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (KP241047.1)	100% <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (S000129670)
TAIB662	1189	Folha	99% <i>Microbacterium paraoxydans</i> (KP780213.1)	100% <i>Microbacterium paraoxydans</i> (S003803464)
TAIB666A	1160	Folha	98% <i>Microbacterium paraoxydans</i> (KP780213.1)	100% <i>Microbacterium paraoxydans</i> (S003803464)
TAIB668A	1158	Folha	99% <i>Curtobacterium citreum</i> (AB506119.1)	100% <i>Curtobacterium citreum</i> (S001574826)

continua

Conclusão

Isolado	Pb	Origem	Percentual de identidade	
			Genbank	RPD
TAIB670	746	Folha	98% <i>Curtobacterium citreum</i> (AB506119.1)	99,4% <i>Curtobacterium citreum</i> (S001574826)
TAIB672	1170	Folha	99% <i>Microbacterium paraoxydans</i> (KP780213.1)	100% <i>Microbacterium paraoxydans</i> (S003803464)
TAIB673	585	Folha	94% <i>Curtobacterium citreum</i> (AB506119.1)	96,5% <i>Curtobacterium citreum</i> (S001574826)
TAIB674	519	Folha	94% <i>Microbacterium paraoxydans</i> (KP780213.1)	94,2% <i>Microbacterium paraoxydans</i> (S003803464)
TAIB676A	734	Folha	99% <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (KY849353.1)	100% <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (S000129670)
TAIB679	642	Folha	99% <i>Bacillus pumilus</i> (KC692204.1)	100% <i>Bacillus pumilus</i> (S000481068)
TAIB686A	1204	Folha	99% <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (KX507137.1)	100% <i>Rhizobium radiobacter</i> (S000001393)
TAIB692A	1176	Folha	99% <i>Pantoea dispersa</i> (KX179628.1)	100% <i>Pantoea dispersa</i> (S000925452)
TAIB698A	1199	Folha	99% <i>Microbacterium paraoxydans</i> (KP780213.1)	98,9% <i>Microbacterium paraoxydans</i> (S003803464)
TAIB698B	1182	Folha	99% <i>Microbacterium arborescens</i>	99,6% <i>Microbacterium arborescens</i> (S000002734)
TAIB706	747	Folha	99% <i>Bacillus safensis</i> (KY820044.1)	100% <i>Bacillus safensis</i> (S000458519)
TAIB713A	1198	Folha	99% <i>Ochrobactrum intermedium</i> (AY654453.1)	100% <i>Ochrobactrum intermedium</i> (S000548808)
TAIB729	1143	Folha	99% <i>Ochrobactrum intermedium</i> (AY654453.1)	100% <i>Ochrobactrum intermedium</i> (S000548808)
TAIB730B	785	Folha	99% <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (KY849353.1)	99,5% <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (S000129670)
TAIB732	1254	Folha	99% <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (KY849353.1)	100% <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (S000129670)

⁽¹⁾ Os números de acessos das espécies do banco de dados Genbank e RPD são apresentados entre parênteses.

Os isolados de bactérias (Tabela 6) foram classificados, em sua maioria, como pertencentes ao filo Proteobacteria (70,4%), seguido do filo Actinobacteria com 19,7% e em menor representação o filo Firmicutes (9,9%) (Figura 17). Considerando os diferentes nichos, os isolados identificados da folha pertenceram aos três filios, havendo predominância de Proteobacteria tanto nos isolados endofíticos como associados. Enquanto que os isolados identificados do fruto pertenceram, em sua totalidade (100%), ao filo Proteobacteria e foram classificados como endofíticos.

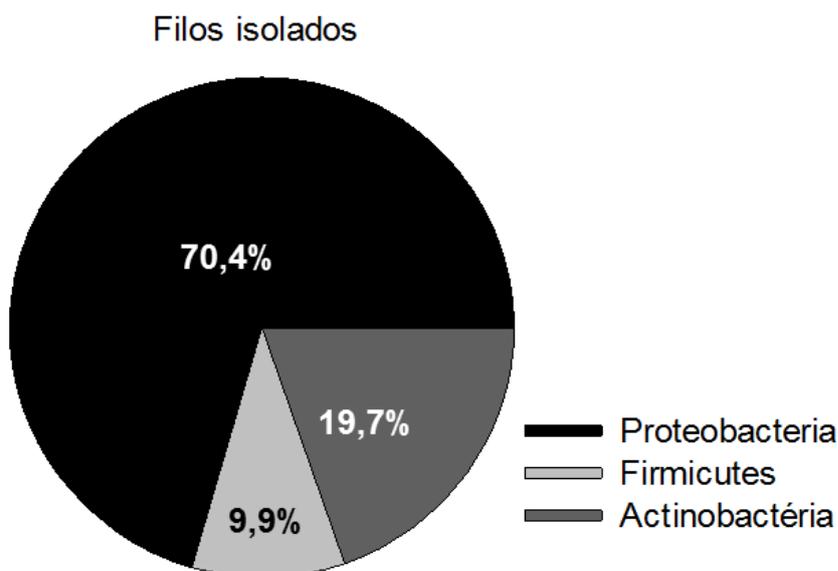


Figura 17 - Representação em percentual dos filios isolados de bactérias endofíticas e associadas de folhas e frutos de melancia.

De acordo com relatos na literatura, esses três filios têm sido os predominantes em estudos com isolados de frutos de melancia (*Citrullus lanatus*) 'Early moonbeam' (GLASSNER et al. 2015), de brotos, raízes e sementes de melancia (*Citrullus lanatus* Thumb.) (XIA et. al, 2015) e de sementes da melancia (*Citrullus lanatus*), em que não houve isolados do filo Actinobacteria (KHALAF; RAIZADA, 2016).

Para uma identificação mais precisa das espécies, as melhores sequências dos isolados e as sequências espécie tipo (*type strain*) correspondentes foram usadas para criar a árvore de máxima verossimilhança (Figura 18).

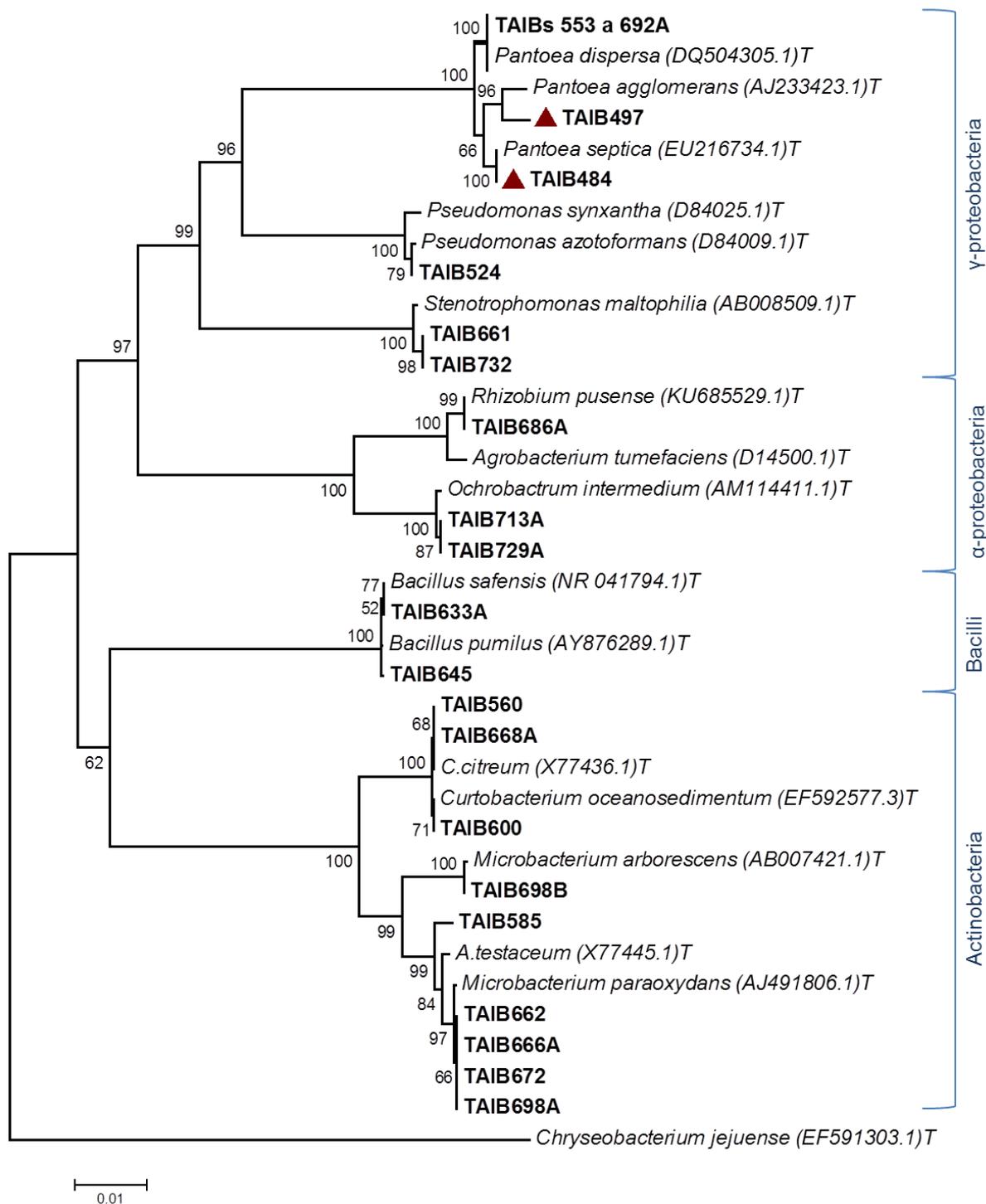


Figura 18 - Representação da filogenia obtida a partir do alinhamento de 34 seqüências da região ribossomal 16S de isolados de bactérias de melancia.

As seqüências em negrito representam as isoladas neste trabalho e o triângulo as isoladas dos frutos. A árvore foi construída usando o método *Neighbor-Joining* e o valor de *bootstrap* (1000 repetições) é mostrado ao lado dos ramos. As distâncias foram calculadas usando o método da Máxima Verossimilhança. **TAIBs 553 a 692A** corresponde às seqüências: TAIB 553, 554, 555, 557, 559, 561, 575, 583, 604, 634, 635A, 639A, 644, 692A. A espécie *Chryseobacterium jejuense* é utilizada como grupo externo (*outgroup*).

A maior parte das sequências dos isolados de folhas e frutos de melancia apresentou percentual de identidade entre 94 a 100% com sequências de espécies tipo depositadas em bancos curados de sequências de bactérias como Genbank e RDP (Tabela 6). Os isolados TAIB 673 e 674 mostraram menor percentual de identidade (94%), mas apresentaram a mesma espécie tipo na comparação com os bancos de dados, correspondendo as espécies *Curtobacterium citreum* e *Microbacterium paraoxydans*, respectivamente.

A análise filogenética da região 16S para a classificação agrupou a maioria das sequências como pertencentes ao gênero *Pantoea* (Tabela 6), relacionando as sequências dos isolados TAIB 497 e 484 às espécies *P. agglomerans* e *P. septica*, respectivamente, e o grupo TAIBs 553 a 692A à espécie *P. dispersa* (e formando clado γ -proteobacteria (Figura 18). Devido à proximidade filogenética de espécies do gênero *Pantoea* outros genes, além da região 16S, genes codificadores de proteínas como *fusA*, *gyrB*, *leuS*, *pyrG*, *rplB*, e *rpoB* são indicados para separar as espécies deste gênero (DELÉTOILE et al., 2009).

O clado γ -proteobacteria, agrupa também seis sequências dos isolados (TAIB 576, 656A, 661, 676A, 730B e 732) que foram identificadas como *Stenotrophomonas maltophilia* (Tabela 6) e estão representadas pelas sequências TAIB 661 e 732 (Figura 18). O isolado TAIB 433 foi identificado como *Enterobacter ludwigii*. A análise filogenética da região 16S permitiu confirmar a identidade das sequências destas espécies e da espécie *Burkholderia cepacia* pelos isolados TAIB 434 e 440 (Tabela 6), pertencentes à classe β -proteobacteria (Figura 18).

As sequências dos isolados TAIB 524 e TAIB 649A, pertencentes ao clado γ -proteobacteria, se agrupou as espécies do gênero *Pseudomonas* (Tabela 6) e está representada pela sequência TAIB 524 (Figura 18). Devido a sua diversidade os genes *gyrB*, *rpoB* e *rpoD* também têm sido utilizados para separação das espécies deste gênero, além do 16S (MULET et al., 2010).

A classe α -proteobacteria agrupou os gêneros *Rhizobium*, *Ochrobactrum* e *Sphingomonas* (Figura 18), em que as sequências dos isolados TAIB 686A foram identificados como *R. radiobacter* (antiga *Agrobacterium tumefaciens*), TAIB 713A e 729A como *O. intermedium* e TAIB 666 e 568 como *S. melonis* (Tabela 6), confirmados pela análise filogenética da região 16S.

O gênero *Bacillus* foi identificado pelas sequências de sete isolados (TAIB 626, 630, 645, 654, 679 e 706) com as espécies *B. altitudinus*, *B. pumilus* e *B. safensis* apresentando grande semelhança (Tabela 6) e representados no clado Bacilli (Figura 18). Para estes grupos de espécies, genes codificadores de proteínas como *gyrB* (gyrase B subunit), e *pyrE*, além do DNAr, são utilizados para análise do tipo multilocus (LIU et al., 2013).

O clado Actinobacteria agrupou espécies dos gêneros *Curtobacterium* e *Microbacterium* (Figura 18), pertencente à família Microbacteriaceae. As sequências de seis isolados (TAIB 560, 579, 594, 668A, 670 e 673) foram identificadas como *C. citreum* (Tabela 6) e estão representadas pelas sequências TAIB 560 e 668A (Figura 18), enquanto que a sequência do isolado TAIB 600 formou um subgrupo com a espécie *C. oceanosedimentum* (Figura 18).

Com relação ao gênero *Microbacterium*, foram identificadas as espécies *M. testaceum*, *M. paraoxydans* e *M. arborescens* (Tabela 6). A sequência do isolado TAIB 698B formou um subgrupo com a espécie *M. arborescens*, e a sequência TAIB 585 esteve mais próxima da espécie *M. testaceum*. A espécie *M. paraoxydans* formou subgrupo representado pelas sequências TAIB 662, 666A, 672 e 698 (Figura 18). Para discriminar espécies intimamente relacionadas da família Microbacteriaceae é utilizado o gene *gyrB*, além do DNAr 16S (RICHERT et al., 2005).

4.2.1.1 Distribuição de isolados de bactérias em folhas e frutos de melancia

Do total de 71 isolados, 22 espécies de 12 gêneros foram obtidas de folhas e frutos de melancia. Devido à diversidade de espécies encontradas, as distribuições dos percentuais de isolados nos diferentes procedimentos (fragmento, macerado, membrana e enriquecimento) e tecidos (folha e fruto) foram consideravelmente pequenos na diversidade de espécies encontradas (Figura 19).

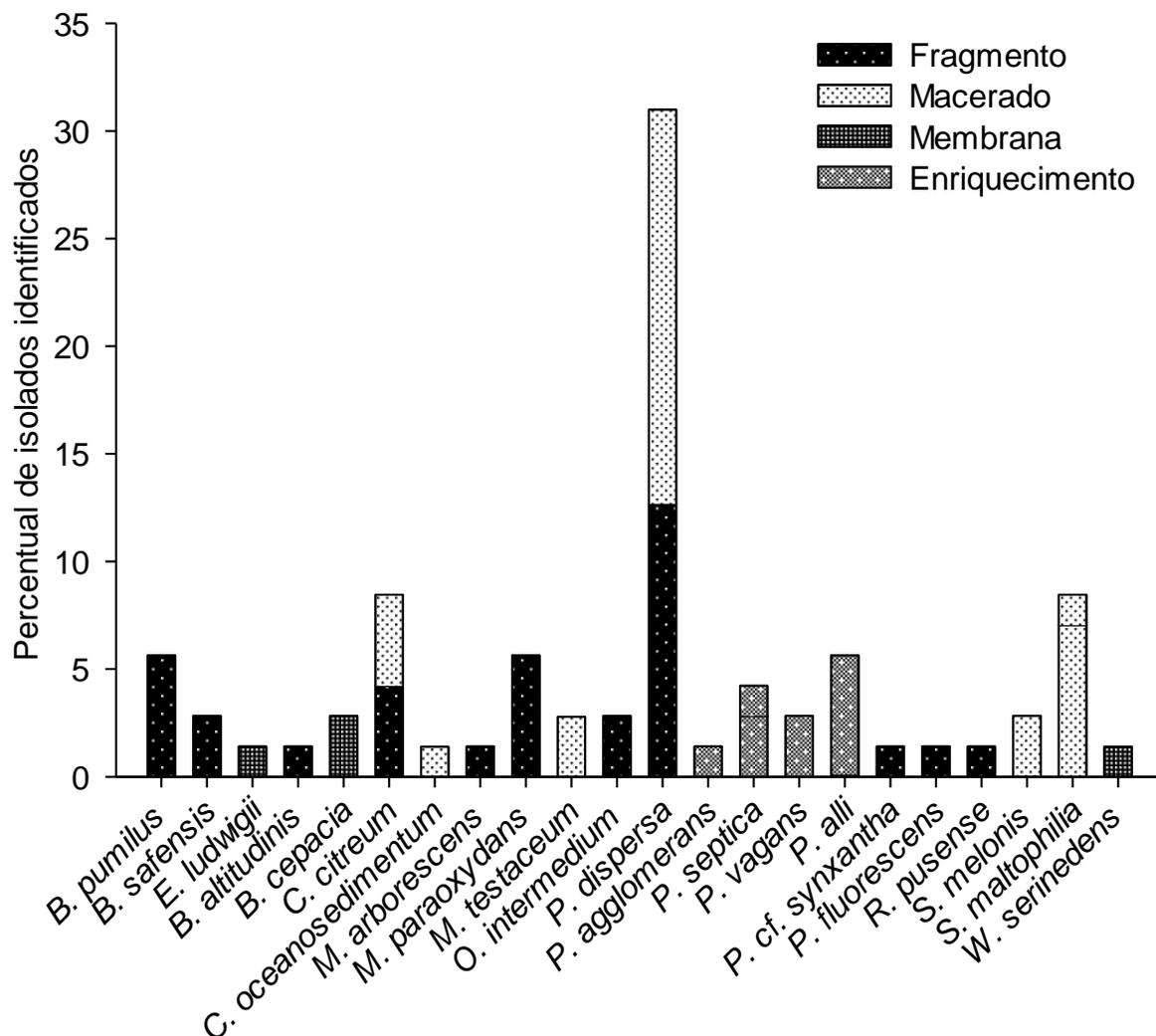


Figura 19 - Percentual de espécies de bactérias isoladas dos procedimentos e tecidos: fragmento (folha), macerado (folha), membrana (suco) e enriquecimento (suco).

Observa-se que as espécies relacionadas aos isolados das folhas (fragmento e macerado) apresentou maior diversidade quando comparada às encontradas no fruto (membrana e enriquecimento) e uma mesma espécie não foi encontrada em tecidos diferentes (folha e fruto), somente nos procedimentos de isolamento diferentes como folha (fragmento e macerado) e fruto (membrana e enriquecimento) (Figura 19).

A espécie encontrada em maior quantidade foi a *P. dispersa*, estando presente apenas no tecido foliar, com 12,7% nos fragmentos e 18,3% no macerado. As espécies *P. agglomerans*, *P. vagans* e *P. alli* foram isoladas no enriquecimento do suco do fruto

nos percentuais de 1,4%, 2,8% e 5,6%, respectivamente, e a espécie e *P. septica* foi isolada tanto no enriquecimento (11,4%) quanto na membrana da filtração do suco (2,8%). As espécies *E. ludwigii* e *B. cepacia* foram também isoladas da membrana da filtração do suco com 1,4% e 2,8%, respectivamente (Figura 19).

Em ambos os procedimentos de folhas, fragmento e macerado, estavam presentes as espécies *C. citreum* com 4,2% cada, e *S. maltophilia* com 7,0% nos fragmentos e 1,4% no macerado. As espécies *C. oceanosedimentum*, *W. serinedens*, *M. testaceum* e *S. melonis* foram encontradas no macerado de folhas nas seguintes percentagens: 1,4% para as duas primeiras espécies e 2,8% para as espécies restantes. As espécies *M. paraoxydans* e *B. pumilus* foram encontradas com 7,0% e 5,6%, respectivamente, seguidas de *B. safensis* e *O. intermedium* com 2,8% cada e *B. altitudinis*, *M. arborescens*, *P. cf. synxantha*, *P. fluorescens* e *R. pusense*, todos com 1,4%, nos fragmentos de folhas (Figura 19).

Glassner et al. (2015) isolando bactérias de diferentes frutos de cucurbitáceas, no Vale de Jezreel (Israel), também encontraram pequeno número de isolados endofíticos nos frutos e correlaciona à sua densidade que parece ser menor quando comparada com outras partes das plantas, como raízes e folhas. Os isolados de bactérias identificados nos frutos de melancia (*Citrullus lanatus*) 'Early moonbeam' foram de espécies diferentes das obtidas neste trabalho, tendo destaque para os isolados *Bacillus subtilis* e *Bacillus vallismortis* com atividade antagonista contra os fungos *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum* f. sp. melonis, *F. oxysporum* f. sp. radicum e contra a bactéria *Pseudomonas syringae*.

B. pumilus e *S. maltophilia*, encontradas no presente trabalho, têm sido relatadas por Xia et al. (2015) isoladas de sementes, raízes e ramos e espécies do gênero *Burkholderia* e os gêneros *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas* em raízes de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), milho (*Zea mays* L.) e melancia (*C. lanatus* Thunb.), em Lexington (USA), apresentando a melancia cultivada no sistema de produção orgânico com maior índice de diversidade. Khalaf; Raizada (2016) isolando bactérias endofíticas de sementes de três variedades de cucurbitáceas *Citrullus lanatus* (Early Canada melhorada, Crimson sweet e fruto fresco de melancia) também identificaram os gêneros *Bacillus* nas três variedades e *Pseudomonas* no fruto fresco.

Herrera et al. (2016) isolaram a espécie *P. agglomerans* de sementes de trigo (*Triticum aestivum* L.), na Argentina, e a destacaram pela sua atividade de produção de

ácido indolacético (AIA), produção de sideróforos, solubilização de fosfato e pela capacidade de crescer em meio livre de nitrogênio. Além disso, este isolado também provocou resistência contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *Vesicatoria*, agente causador da doença da mancha foliar e preveniu o crescimento de *Fusarium graminearum*. Neste mesmo trabalho, cita-se a estirpe A-9 da espécie *Pantoea vagans*, que é comercialmente registrada como controle biológico da queima bacteriana, doença causada por *Erwinia amylovora* em peras e macieiras.

A espécie identificada nos isolados em maior quantidade, *P. dispersa*, também foi relacionada a isolados endofíticos da raiz de mandioca (*M. esculenta* Crantz), no sudeste da China, por Chen et al. (2014) e apresentou habilidade de alta solubilização de fosfato que limitam a utilização de fosfato em solo ácido vermelho, e produziu metabólitos de solubilização mineral de fosfato. Endofíticos capazes de solubilizar fosfato possibilitam a disponibilidade de fósforo para a planta que é um elemento essencial para o seu crescimento (CHEN et al., 2014).

Os gêneros *Bacillus*, *Curtobacterium*, *Microbacterium* e *Pseudomonas* foram identificados em isolados endofíticos provenientes de folhas e caule de *Lolium perene*, no sul da Polônia, por Kukla et al. (2014) relatando a espécie *C. citreum* foi relatada como produtora de AIA, a espécie *P. fluorescens* como solubilizadora de fosfato e os gêneros *Pseudomonas* e *Microbacterium* como estirpes produtoras de biosurfactantes e bio-emulsionantes que são fatores limitantes para a eficácia da biorremediação. Shoebitz et al. (2009) estudaram a mesma espécie de planta e isolaram endofíticos da rizosfera de plantas da província de Valdivia (Chile), apresentando a espécie *Enterobacter ludwigii* como produtora de AIA e inibidora do crescimento do fungo *Fusarium solani*.

Etesami e Hossein (2016) relataram a espécie *S. maltophilia*, isolada de sementes de arroz (*Oryza sativa* L.), em Mazandaran, Irã, como um endofítico produtor de AIA, sideróforos, solubilizador de fosfato e atividade quitinase, além de inibir o crescimento do fungo *Magnaporthe grisea* pela produção de antibióticos e/ou substâncias antifúngicas. Na ausência deste patógeno, *S. maltophilia* demonstrou estimular o crescimento da planta.

No Brasil, Beneduzi et al. (2013) isolaram os gêneros *Bacillus*, *Burkholderia*, *Microbacterium*, *Ochrobactrum*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Sphingomonas* e *Stenotrophomonas* de amostras do solo, raiz e caule da rizosfera de variedades de cana-de-açúcar de regiões do Estado do Rio Grande do Sul. O gênero

Burkholderia se destacou por produzir componentes indólicos e sideróforos, além de ser capaz de solubilizar fosfato. Ikeda et al. (2012) também isolou bactérias endofíticas dos gêneros *Burkholderia*, *Bacillus* e *Pantoea* de amostras de genótipos de milho, de Campo Largo – Paraná, e os relatou como agentes promotores de crescimento e com potencial fixação de nitrogênio. Esses mesmos isolados foram estudados por Szilagyi-Zecchin et al. (2014) que apontaram o gênero *Bacillus* como produtor de amônia, de AIA e de enzimas, além de possuir a capacidade de inibir o crescimento fúngico dos fungos *Bipolaris maydis*, *Colletotrichum graminicola* e *Cercospora zea-maydis*.

Os gêneros *Sphingomonas* e *Williamsia* possuem pequena relação como endofíticos de plantas. Khan et al. (2014) isolaram endofíticos relacionados ao gênero *Sphingomonas* de folhas de *Tephrosia apollinea* (Papilionaceae), no Sultanato de Omã (Arábia), caracterizando-o como produtor de AIA e giberelinas (GAs) que contribuíram para o aumento dos atributos de crescimento. Kaewkla e Franco (2012) relataram o gênero *Williamsia*, pela primeira vez, como endofítico de duas árvores nativas australianas *Callitris preissii* (Native Pine) e *Eucalyptus microcarpa* (Grey Box), em Adelaide, Sul da Austrália.

Dos isolados identificados, a espécie *B. cepacia* é um agente patógeno oportunista humano, especialmente em pacientes com fibrose cística (FC), doença genética fatal que afeta 1,5 em 2000 indivíduos predispostos (CHIARINI et al., 2006). *S. maltophilia* também é considerada um potencial patógeno humano e está associada a infecções bacterianas e pneumonia em pacientes imunocomprometidos com alta taxa de mortalidade (RYAN et al., 2009).

Isolados clínicos da espécie *Pseudomonas fluorescens* estão relacionados às infecções no sangue tem sido rara e esporádica e sua associação com doenças respiratórias e inflamações intestinais ainda é incerta, podendo estar associada a hospedeiros humanos imunocomprometidos ou por meio da contaminação aos hospedeiros (SCALES et al., 2014).

A espécie *Pantoea agglomerans* é considerada como patógeno oportunista em humanos imunocomprometidos, ocasionando infecções clínicas como artrite séptica ou sinovite, sendo também patógeno de plantas causando doenças em cultivares de algodão e cebola (DUTKIEWICZ et al., 2016). Outro fitopatógeno identificado é *Sphingomonas melonis* que é um agente causal da mancha marrom no melão amarelo

(*Cucumis melo* var. *Inodorus*, melão Espanhol) havendo a hipótese de ser epifítico no melão, aumentando a probabilidade de infecção do fruto (BUONAURO et al., 2002).

Entretanto, isolados não clínicos de *S. maltophilia* e *P. fluorescens* têm sido utilizados como agentes de biocontrole agrícola e isolados de *B. cepacia* do solo e da rizosfera como promotores de crescimento e biocontrole de plantas (CHIARINI et al., 2006; ETESAMI; ALIKHANI, 2016).

4.2.2 Leveduras

Com relação às leveduras, foram selecionados 220 isolados e obtidos produtos de amplificação do domínio D1/D2 (aproximadamente 600 pb) para 164 isolados que estão representados pela amplificação das bandas de produtos de PCR com os oligonucleotídeos NL1 e NL4 (Figura 20).

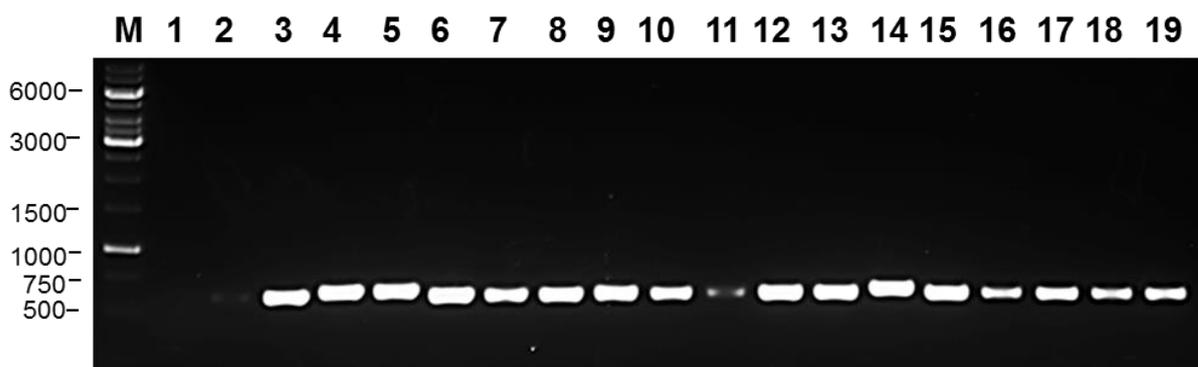


Figura 20 - Produtos de amplificação da região 26S (domínio D1/D2) do DNA ribossômico de leveduras endofíticas e associadas obtidas de fohas e frutos de melancia.

M marcador Ruler 1 kb Ladder (Thermo Fisher Scientific), **1.** TAIL 110, **2.** 117, **3.** 126, **4.** 130, **5.** 132, **6.** 138, **7.** 139, **8.** 140 **9.** 146, **10.** 154, **15.** 155, **12.** 156, **13.** 70A, **14.** 80B, **15.** 89, **16.** 66, **17.** 86, **18.** 112, **19.** 26 (gel 1% agarose).

Foram sequenciadas 92 amostras dos isolados obtidos. A identificação das seqüências dos isolados de leveduras se deu pela comparação com espécies depositadas nos bancos de dados Genbank, RDP e Mycobank (Tabela 7).

Tabela 7 - Identificação das sequências de isolados de leveduras endofíticas e associadas a folhas e frutos de melancia por meio da região 26S (domínio D1/D2) do DNA ribossômico.

Isolado	Pb	Origem	Percentual de identidade		
			Genbank	Mycobank	RPD
TAIL04	498	Fruto	99% <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (KX101034.1)	99,8% <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (CBS 7957)	100% <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (S000497605)
TAIL26	571	Fruto	99% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	99,8% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL50	571	Folha	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL51	571	Folha	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL58	571	Folha	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL61	571	Folha	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL62A	571	Folha	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL63	571	Folha	99% <i>Pseudozyma antarctica</i> (JQ650240.1)	99,8% <i>Pseudozyma antarctica</i> (CBS 516.83)	98,9% <i>Pseudozyma antarctica</i> (S003824472)
TAIL65A	571	Folha	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL65B	605	Folha	99% <i>Pseudozyma antarctica</i> (JQ650240.1)	99,7% <i>Pseudozyma antarctica</i> (CBS 516.83)	100% <i>Pseudozyma antarctica</i> (S003824472)

Continua

Continuação

Isolado	Pb	Origem	Percentual de identidade		
			Genbank	Mycobank	RPD
TAIL68A	571	Folha	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL70A	539	Folha	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL73	593	Folha	100% <i>Pseudozyma aphidis</i> (AB617892.1)	99,7% <i>Pseudozyma aphidis</i> (CBS 517.83)	100% <i>Pseudozyma aphidis</i> (S003817228)
TAIL76A	535	Folha	99% <i>Pseudozyma aphidis</i> (AB617892.1)	99,3% <i>Pseudozyma aphidis</i> (CBS 517.83)	100% <i>Pseudozyma aphidis</i> (S003817228)
TAIL76B	551	Folha	99% <i>Pseudozyma aphidis</i> (AB617892.1)	99,3% <i>Pseudozyma aphidis</i> (CBS 517.83)	100% <i>Pseudozyma aphidis</i> (S003817228)
TAIL77	571	Folha	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL78	600	Folha	99% <i>Pseudozyma aphidis</i> (AB617892.1)	99,6% <i>Pseudozyma aphidis</i> (CBS 517.83)	100% <i>Pseudozyma aphidis</i> (S003817228)
TAIL80B	605	Folha	99% <i>Pseudozyma aphidis</i> (AB617892.1)	99,5% <i>Pseudozyma aphidis</i> (CBS 517.83)	100% <i>Pseudozyma aphidis</i> (S003817228)
TAIL84	605	Folha	100% <i>Pseudozyma aphidis</i> (AB617892.1)	99,7% <i>Pseudozyma aphidis</i> (CBS 517.83)	100% <i>Pseudozyma aphidis</i> (S003817228)
TAIL86	571	Folha	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL88	571	Folha	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)

continua

Continuação

Isolado	Pb	Origem	Percentual de identidade		
			Genbank	Mycobank	RPD
TAIL89	571	Folha	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL95	591	Folha	100% <i>Hannaella sinensis</i> (AF459658.1)	99,5% <i>Hannaella sinensis</i> (CBS 7225)	100% <i>Hannaella sinensis</i> (CBS 7238)
TAIL98	571	Folha	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL103	494	Folha	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	99,4% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL104	571	Folha	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL107	530	Folha	99% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	99,5% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL108	571	Folha	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL110	566	Folha	99% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	99,6% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL112	571	Folha	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL116	572	Folha	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	99,8% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL117	571	Folha	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	99,7% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL119	571	Folha	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	99,8% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)

continua

Continuação

Isolado	Pb	Origem	Percentual de identidade		
			Genbank	Mycobank	RPD
TAIL121	561	Folha	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	98,2% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL124	571	Folha	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	99,8% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL125	571	Folha	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL126	571	Folha	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL130	605	Folha	100% <i>Pseudozyma aphidis</i> (AB617892.1)	99,7% <i>Pseudozyma aphidis</i> (CBS 517.83)	100% <i>Pseudozyma aphidis</i> (S003817228)
TAIL133A	500	Folha	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL133B	605	Folha	99% <i>Pseudozyma aphidis</i> (AB617892.1)	99,5% <i>Pseudozyma aphidis</i> (CBS 517.83)	100% <i>Pseudozyma aphidis</i> (S003817228)
TAIL135	539	Folha	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL136	539	Folha	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL137	571	Folha	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL138	571	Folha	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	99,8% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL140	571	Folha	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)

continua

Continuação

Isolado	Pb	Origem	Percentual de identidade		
			Genbank	Mycobank	RPD
TAIL141	561	Folha	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL143	571	Folha	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL144	571	Folha	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL145	571	Folha	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL146	571	Folha	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL148	571	Folha	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL152	572	Folha	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	99,8% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	99,3% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL153	571	Folha	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL155	571	Folha	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL156	571	Folha	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL159	571	Folha	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL161	563	Folha	99% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	99,8% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)

continua

Continuação

Isolado	Pb	Origem	Percentual de identidade		
			Genbank	Mycobank	RPD
TAIL163	609	Folha	99% <i>Pseudozyma aphidis</i> (AB617892.1)	99,4% <i>Pseudozyma aphidis</i> (CBS 517.83)	100% <i>Pseudozyma aphidis</i> (S003817228)
TAIL164	494	Folha	99% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL165	553	Folha	99% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	99,7% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL167	606	Folha	99% <i>Pseudozyma aphidis</i> (AB617892.1)	99,5% <i>Pseudozyma aphidis</i> (CBS 517.83)	100% <i>Pseudozyma aphidis</i> (S003817228)
TAIL170	571	Folha	99% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	99,8% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL171	494	Folha	99% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL172	571	Folha	99% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	99,3% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL174	571	Folha	99% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	99,8% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL177	567	Folha	99% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	99,8% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	97,2% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL178	605	Folha	99% <i>Pseudozyma aphidis</i> (AB617892.1)	99,5% <i>Pseudozyma aphidis</i> (CBS 517.83)	100% <i>Pseudozyma aphidis</i> (S003817228)
TAIL179	521	Folha	99% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	99,8% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL181	571	Folha	99% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	99,5% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)

continua

Continuação

Isolado	Pb	Origem	Percentual de identidade		
			Genbank	Mycobank	RPD
TAIL184	571	Folha	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL188	493	Folha	99% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	99,8% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL190	417	Folha	95% <i>Pseudozyma aphidis</i> (AB863569.1)	94,7% <i>Moesziomyces aphidis</i> (CBS 12818)	100% <i>Pseudozyma aphidis</i> (S003817228)
TAIL206	560	Folha	99% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	99,6% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL208	605	Folha	99% <i>Pseudozyma aphidis</i> (AB617892.1)	99,2% <i>Pseudozyma aphidis</i> (JCM 10318)	100% <i>Pseudozyma aphidis</i> (S003817228)
TAIL209	507	Folha	99% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	99,6% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	97,9% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL214	571	Folha	99% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	99,5% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL215	571	Folha	99% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	99,8% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	99,8% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL218	511	Folha	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL219	571	Folha	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL20	591	Fruto	99% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL22	571	Fruto	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)

continua

Conclusão

Isolado	Pb	Origem	Percentual de identidade		
			Genbank	Mycobank	RPD
TAIL221	571	Folha	99% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	99,6% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL222	477	Folha	99% <i>Bulleromyces albus</i> (AF444759.1)	100% <i>Bulleromyces albus</i> (CBS 501)	100% <i>Bulleromyces albus</i> (S000458930)
TAIL23	571	Fruto	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL230	571	Folha	99% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (EU003452.1)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (CBS 484)	100% <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (S003820341)
TAIL231	605	Folha	100% <i>Pseudozyma aphidis</i> (AB617892.1)	100% <i>Pseudozyma aphidis</i> (JCM 10318)	100% <i>Pseudozyma aphidis</i> (S003817228)
TAIL232	605	Folha	100% <i>Pseudozyma aphidis</i> (AB617892.1)	100% <i>Pseudozyma aphidis</i> (JCM 10318)	100% <i>Pseudozyma aphidis</i> (S003817228)
TAIL246	605	Folha	100% <i>Pseudozyma aphidis</i> (AB617892.1)	100% <i>Pseudozyma aphidis</i> (JCM 10318)	100% <i>Pseudozyma aphidis</i> (S003817228)

⁽¹⁾ Os números de acessos das espécies dos bancos de dados Genbank, Micobank e RPD são apresentados entre parênteses.

As sequências dos isolados de folhas e frutos de melancia, em sua maioria (76,1%), apresentou alto percentual de identidade (97,2-100%) com sequências de espécie tipo *S. pararoseus* (Tabela 7). A análise filogenética da região 26S (domínio D1/D2) para a classificação permitiu confirmar a identidade das sequências relacionadas às espécies *S. pararoseus*, *H. sinensis* e *B. albus*, formando as classes Sporidiobolales e Tremellomyces, respectivamente (Figura 21).

O quantitativo de 19 sequências foi relacionado ao gênero *Pseudozyma* sp. com consideráveis percentuais de identidade (94,7-100%) (Tabela 7). As sequências TAIL 63 e 65B formaram um subgrupo com a espécie *P. antarctica* e as outras sequências, representadas pelo grupo TAILS 67 a 246 com a espécie *P. aphidis*, representando a classe Ustilaginomyces (Figura 21). Considerando a diversidade de espécies, o gene codificador de proteína rbp2 também é capaz discriminar espécies filogeneticamente, além da região 26S, domínio D1/D2, e ITS (VETROVSKY et al., 2016).

A sequência TAIL 04 foi a única pertencente ao filo Ascomycota, da classe Saccharomycetes (Figura 21), apresentando percentual de identidade (99%) com a espécie *S. cerevisiae*. Devido a proximidade das espécies *S. cerevisiae* e *S. bayanus*, outros genes, além da região 26S, genes mitocondriais como COX II são indicados para analisar suas relações filogenéticas (KURTZMAN; ROBNETT, 2003).

4.2.2.1 Distribuição de isolados de leveduras em folhas e frutos de melancia

O percentual das espécies de leveduras endofíticas e associadas obtidas dos diferentes procedimentos: fragmento, macerado, membrana, enriquecimento e concentrado dos tecidos, folha e fruto, de melancia está apresentado na Figura 22.

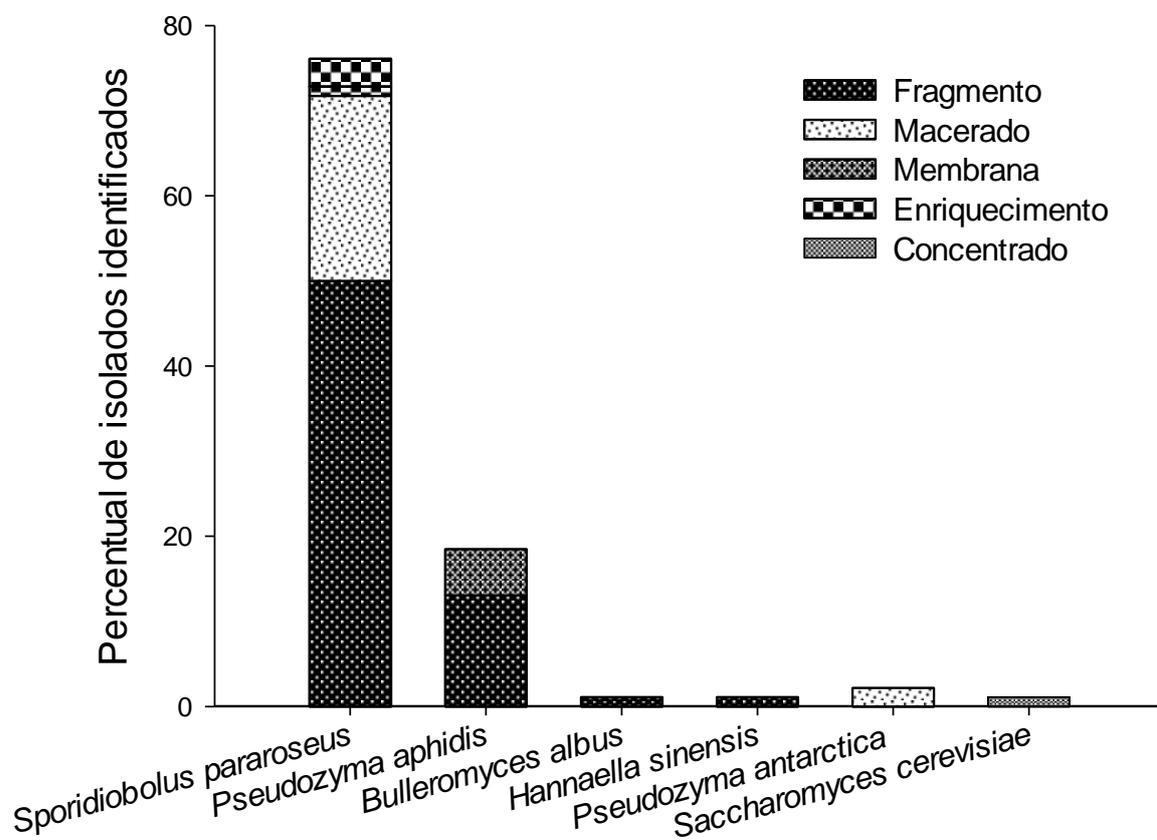


Figura 22 - Percentual de espécies de leveduras isoladas dos procedimentos e tecidos: fragmento (folha), macerado (folha), membrana (suco), enriquecimento (suco) e concentrado (suco).

Os isolados de leveduras, isolados pela primeira vez em melancia, apresentaram uma diversidade pequena de espécies e houve a predominância da espécie *S. pararoseus*. Esta espécie foi isolada em ambos os tecidos, folha e fruto, sendo encontrada nos fragmentos (50%) e macerado (21,7%) de folhas, no enriquecimento (3,3%) e na membrana filtrada (1,1%) do suco do fruto em estágio de maturação avançada (Figura 22). Na literatura há poucos relatos sobre leveduras endofíticas isoladas de frutos e, neste contexto, Tristão et al. (2012) ao analisarem frutos de abacaxi também observaram uma baixa frequência de isolados de leveduras, em média 3,3 isolados por fruto de abacaxi.

A espécie *P. aphidis* esteve presente no tecido foliar, com 13% nos fragmentos e 5,4% no macerado. Outras espécies como *P. antarctica*, *B. albus* e *H. sinensis* foram

isoladas de fragmentos de folhas de melancia em menor quantitativo, 2,2% e 1,1%, respectivamente, e a espécie *S. cerevisiae* apresentou percentual de 1,1% no concentrado enriquecido do suco do fruto maduro (Figura 22).

Brysch-Herzberg e Seidel (2015) encontraram as espécies *S. pararoseus* e *B. albus* em isolados de sucos de uvas de duas regiões vinícolas da Alemanha. Em um estudo com leveduras epifíticas isoladas de frutos tropicais no sudoeste do Oceano Índico, Grondin et al. (2015) isolaram *S. cerevisiae* em feijões de cacau e *S. pararoseus* da pele de frutos, o qual apresentou capacidade para produzir compostos voláteis como álcoois e cetonas de interesse para a indústria de alimentos.

Huang et al. (2012) isolaram *S. pararoseus* de folha saudável de morango (*F. ananassa*) cultivada na cidade de Yi Chang, China, o qual produziu compostos orgânicos voláteis (COVs) com atividade anti-fúngica, como 2-etil-1-hexanol, que foi eficaz na supressão tanto da germinação conidial como no crescimento micelial de *Botrytis cinerea* na pós-colheita de frutos de morango. Além disso, esta espécie, isolada de diferentes plantas e amostras, têm sido relatada como boa produtora de carotenoides, importante para indústria alimentícia, farmacêutica, cosmética e biotecnológica (VALDUGA et al., 2014).

As espécies *S. cerevisiae* e *P. antarctica* foram isoladas por Trindade et al. (2002) de polpas congeladas de acerola e mangaba e, de frutos maduros de pitanga e acerola, respectivamente. Estes autores suspeitaram que a presença da espécie *S. cerevisiae* pode ter sido por estar presente no equipamento durante o processamento. Este fato também pode ter ocorrido no presente trabalho, já que o concentrado do suco de melancia não foi processado em condições assépticas. A espécie *P. antarctica* apresentou atividade killer, também identificada em *S. cerevisiae*, além de atividade protease, pectinase e capacidade hidrolisar arbutina, importantes para a biotecnologia, no desenvolvimento de novos produtos.

Isolados da espécie *P. antarctica* e *H. sinensis* foram obtidos de folhas de arroz e cana-de-açúcar na Tailândia por Nutarat et al. (2015) e apresentaram resultados para produção de sideróforos e, especificamente isolados *P. antarctica*, para produção de poliamina e protease. Buxdorf et al. (2015) isolaram *P. aphidis* foram de folhas de morango com atividade para reduzir infecções do fungo *B. cinerea* em plantas de tomate, que provavelmente ocorreu pela indução de ácido jasmônico (JA) e ácido salicílico (AS). Ademais, *P. aphidis* e *P. antarctica* são citadas como espécies

produtoras de Manosileritritol lipídio (MEL), que são glicolípídeos com propriedades biosurfactantes de potencial interesse industrial (FARIA et al., 2014; FARIA, et al., 2015).

No Brasil, Baffi et al. (2011) isolaram leveduras da superfície de bagas de uvas saudáveis e não danificadas e do mosto de uvas de duas variedades de *Vitis labrusca* (Isabel e Bordeaux), na região de Jales, São Paulo, associadas também às espécies *S. cerevisiae* e *S. pararoseus*, respectivamente. A espécie *P. aphidis* foi isolada de frutos de abacaxi (*Ananas comosus*), na região central do Estado do Tocantins, e um isolado de *S. cerevisiae* de dornas de fermentação de caldo de cana mostrou-se capaz em reduzir a incidência de doenças nos frutos (TRISTÃO et al., 2012).

4.2.3 Espécies endofíticas e associadas de folhas de melancia

As espécies identificadas das folhas de melancia, tratadas com a condição de desinfestação 4, foram consideradas como endofíticas (interna) e os isolados da condição 3 como associadas (externa), conforme esquema representativo (Figura 23).

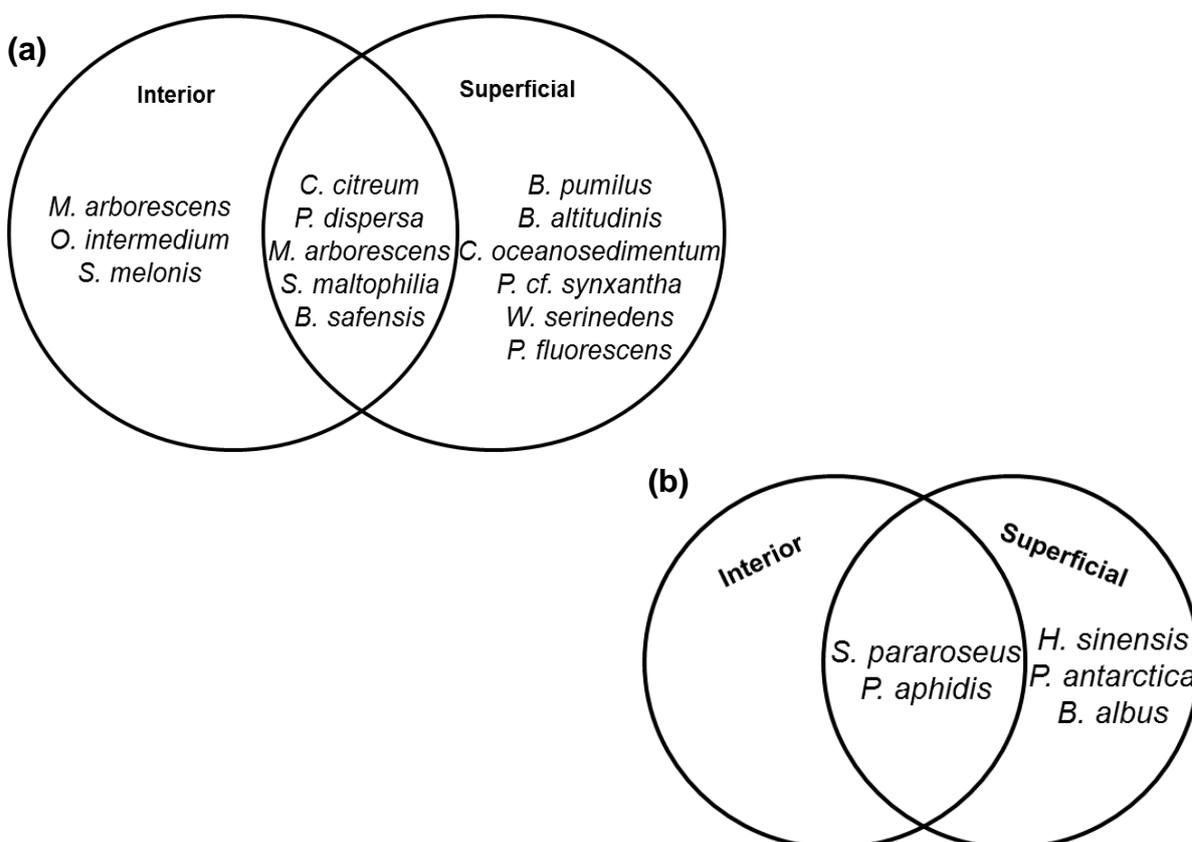


Figura 23 - Esquema representativo de espécies de (a) bactérias e (b) leveduras obtidas da superfície interna e externa de folhas de melancia.

Identificou-se uma menor variedade de espécies de isolados de leveduras comparada ao de bactérias o que pode estar relacionado à influência do uso de agrotóxicos, principalmente fungicidas amplamente usados nos cultivos convencionais (TRISTÃO et al., 2012). Estudos mostram que abundância relativa de espécies de isolados endofíticos varia significativamente em plantas de práticas orgânicas e de práticas convencionais, sendo isoladas em maior quantidade em plantas cultivadas organicamente (XIA et al., 2015).

Observa-se que os isolados de bactérias relacionados às espécies *C. citreum*, *P. dispersa*, *M. paraoxydans* e *S. maltophilia* e os isolados de leveduras relacionados às espécies *S. pararoseus* e *P. aphidis* foram encontrados em ambas as superfícies, interna e externa (Figura 23), de folhas de melancia, sendo considerados neste trabalho como endofíticos e associados. Isaeva et al. (2010) relataram que espécies de isolados de leveduras podem ser detectadas tanto no tecido interno como na superfície dos frutos, indicando sua penetração no fruto por meio de micro-danos em tecidos e pelos estômatos. A entrada do microrganismo que vive na superfície para o interior do tecido de seu hospedeiro se torna possível por aberturas naturais tais como estômatos, raízes e/ou pelo desenvolvimento de algum tipo de especificidade ao nível de deformação, como a ação das enzimas, e transportados por insetos (PETRINI, 1990; LUGTENBERG et al., 2016).

Os isolados de bactérias referentes às espécies *R. pusense*, *M. arborescens*, *O. intermedium*, *S. melonis* e *M. testaceum* estiveram presentes apenas no interior das folhas de melancia, sendo considerados endofíticos. Já os isolados referentes às espécies *B. pumilus*, *B. altitudinis*, *P. cf. synxantha*, *C. oceanosedimuntum* e *P. relictisesami* e as espécies de leveduras *H. sinensis*, *P. antarctica* e *B. albus* foram isoladas da superfície externa da folha (Figura 23), sendo considerados então associados.

4.3 Teste de antagonismo de isolados de leveduras contra fungos fitopatogênicos

Todos os isolados de leveduras, *S. cerevisiae* (TAIL 04), *P. antarctica* (TAIL 63), *S. pararoseus* (TAIL 66) e *H. sinensis* (TAIL 95), após 10 dias, apresentaram atividade antagonística para o fungo *P. oryzae*, os isolados *S. cerevisiae* (TAIL 04) e *P.*

antarctica (TAIL 63) para os fungos *S. sclerotiorum*, *Alternaria* sp. e *C. lunata* e o isolado *P. antarctica* (TAIL 63) para *Didymella* sp., demonstrado pelo percentual de inibição do crescimento radial (PIRG) (Figura 24).

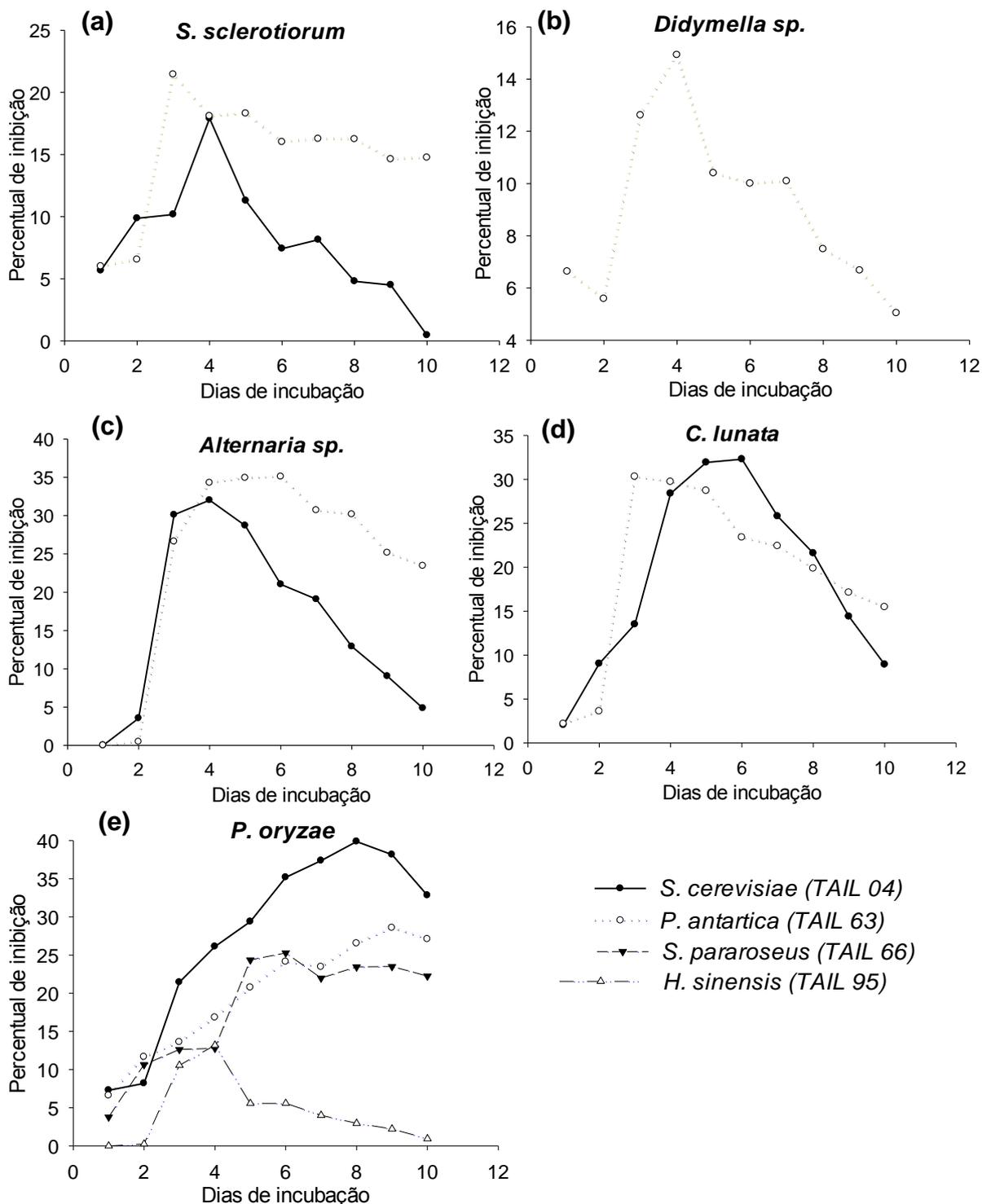


Figura 24 - Percentual de inibição do crescimento radial dos fungos (a) *S. sclerotiorum*, (b) *Didymella* sp., (c) *Alternaria* sp., (d) *C. lunata* e (e) *P. oryzae* pelos isolados de leveduras *S. cerevisiae* (TAIL 04), *P. antarctica* (TAIL 63), *S. pararoseus* (TAIL 66) e *H. sinensis* (TAIL 95).

Observa-se que a eficiência da atividade antagonística dos isolados de leveduras foi reduzindo de acordo com tempo de exposição, exceto para o fungo *P. oryzae* em que o percentual de inibição dos isolados *S. cerevisiae* (TAIL 04) e *P. antarctica* (TAIL 63) foram aumentando (Figura 24e). Os isolados antagonistas apresentaram comportamentos similares, o que é percebido pelas curvas dos percentuais de inibição, que aumentaram e reduziram sua eficiência de acordo com o fungo analisado (Figura 24a - d).

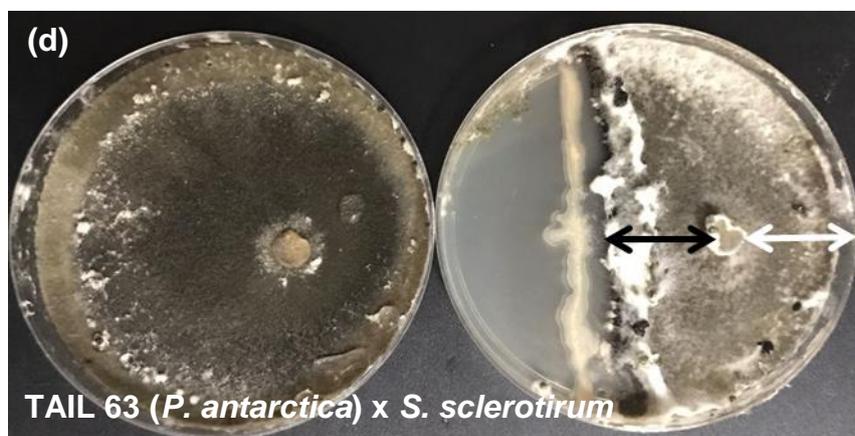
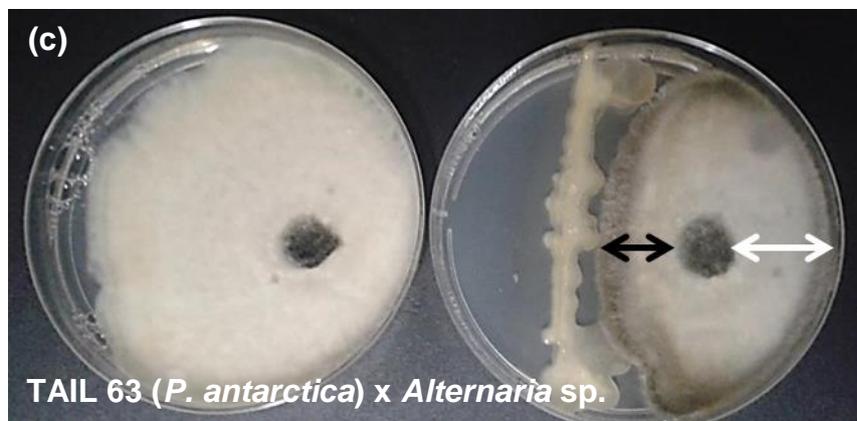
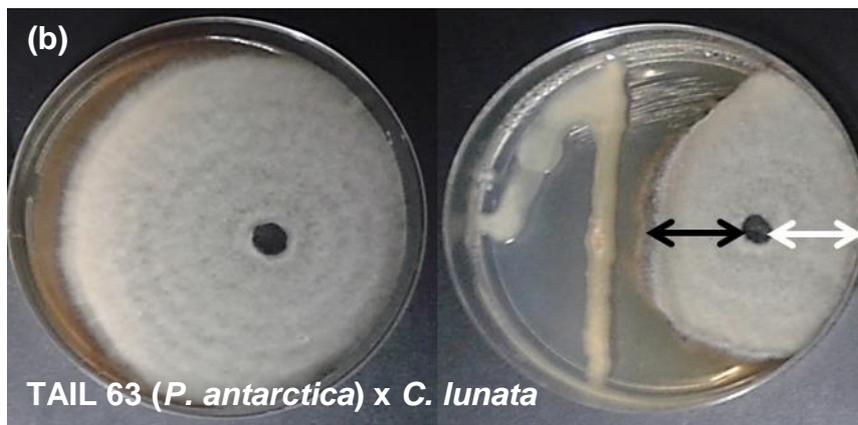
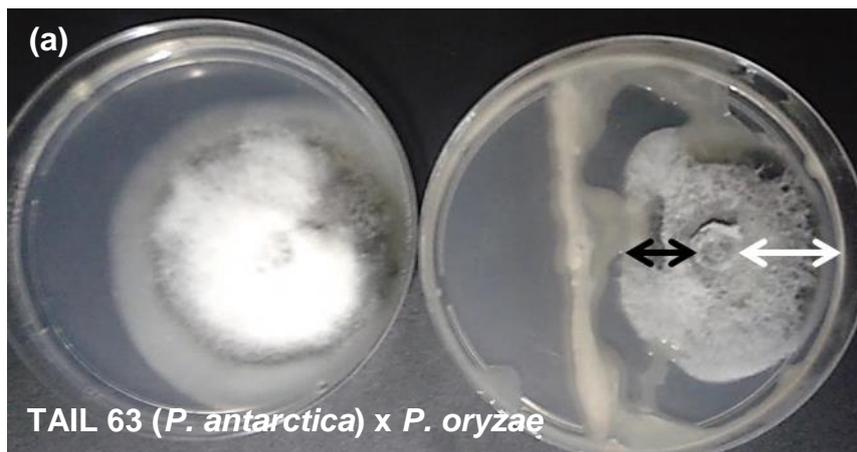
Ao final de 10 dias, os percentuais de inibição do crescimento radial dos fungos *Alternaria* sp., *P. oryzae*, *C. lunata*, *S. sclerotiorum* e *Dydimella* sp. pelos isolados de levedura estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Percentual de inibição do crescimento radial de fungos fitopatogênicos pelos isolados de leveduras associadas obtidas de folhas e frutos de melancia.

Antagonista	Fungo	Percentual de inibição (%)
<i>S. cerevisiae</i> (TAIL 04)	<i>P. oryzae</i>	32,82 (\pm 2,29) a
<i>P. antarctica</i> (TAIL 63)	<i>P. oryzae</i>	27,14 (\pm 5,46) ab
<i>P. antarctica</i> (TAIL 63)	<i>Alternaria</i> sp.	23,44 (\pm 0,37) abc
<i>S. pararoseus</i> (TAIL 66)	<i>P. oryzae</i>	22,24 (\pm 2,78) abc
<i>P. antarctica</i> (TAIL 04)	<i>C. lunata</i>	15,46 (\pm 2,15) bcd
<i>P. antarctica</i> (TAIL 63)	<i>S. sclerotiorum</i>	14,74 (\pm 2,39) bcd
<i>S. cerevisiae</i> (TAIL 63)	<i>C. lunata</i>	8,90 (\pm 2,17) cd
<i>P. antarctica</i> (TAIL 63)	<i>Dydimella</i> sp.	5,04 (\pm 1,65) d
<i>H. sinensis</i> (TAIL 95)	<i>P. oryzae</i>	1,22 (\pm 0,18) d
<i>S. cerevisiae</i> (TAIL 63)	<i>S. sclerotiorum</i>	0,38 (\pm 0,81) d

*Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O isolado *P. antarctica* (TAIL 63) foi o que inibiu o maior número de fungos fitopatogênicos avaliados, obtendo os percentuais de 27,14% (\pm 5,46) para *P.oryzae*, 23,44% (\pm 0,37) para *Alternaria* sp., que não apresentaram diferenças estatísticas, de 15,46% (\pm 2,15) para *C. lunata* e 14,74% (\pm 2,39) para *S. sclerotiorum*, os quais não diferiram estatisticamente, e de 5,04% (\pm 1,65) para *Dydimella* sp (Figura 25).



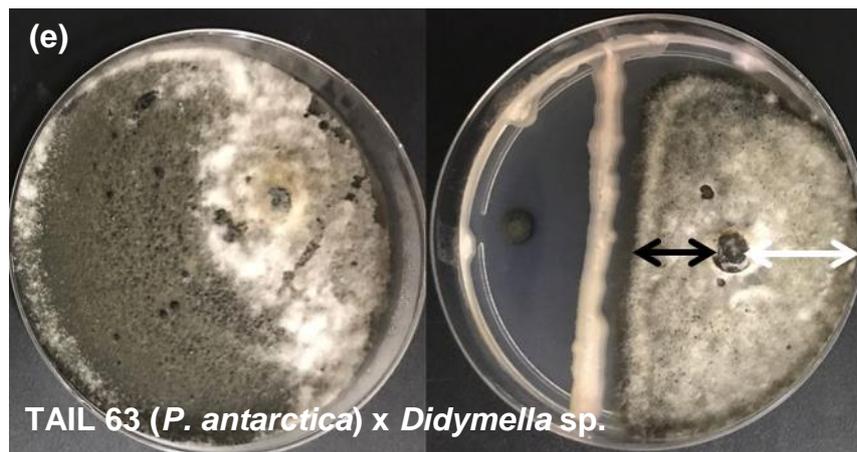


Figura 25 - Inibição do crescimento radial dos fungos (a) *P. oryzae*, (b) *Alternaria* sp., (c) *C. lunata*, (d) *S. sclerotium* e (e) *Didymella* sp. pelo isolado *P. antarctica* (TAIL 63). A seta preta indica o crescimento de Raio 2 (R2) e a seta branca o crescimento do Raio 1 (R1).

Comparando com as placas controles (Figura 25), o isolado *P. antarctica* (TAIL 63) inibiu notavelmente o crescimento radial (raio 2) em 46,15%, 58,50%, 57,71%, 60,42% e 55,91% os fungos *P. oryzae*, *Alternaria* sp., *C. lunata*, *S. sclerotium* e *Didymella* sp, respectivamente.

Estudos recentes têm relatado a atividade antagonística de *P. antarctica* contra outros tipos de fungos. Liu et al. (2017) isolaram *P. antarctica* de pomares de citrus e apresentou maior biocontrole de *Penicillium digitatum in vitro*, confirmado pelo maior halo de inibição, sugerindo estar relacionado a produção de compostos antifúngicos. Neste contexto, Yoshida et al. (2015) demonstraram que os biosurfactantes manosileritritol lipídios (MELs) produzidos por *P. antarctica* têm o potencial de suprimir os sintomas necróticos causados por conídios do fungo *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* nas folhas de trigo.

O isolado *S. cerevisiae* (TAIL 04) inibiu o crescimento radial dos fungos *P. oryzae* em 32,82% ($\pm 2,29$), *C. lunata* em 8,90% ($\pm 2,17$) e *S. sclerotium* 0,38% ($\pm 0,81$), não apresentando diferença estatística entre os dois últimos (Tabela 8 e Figura 26).

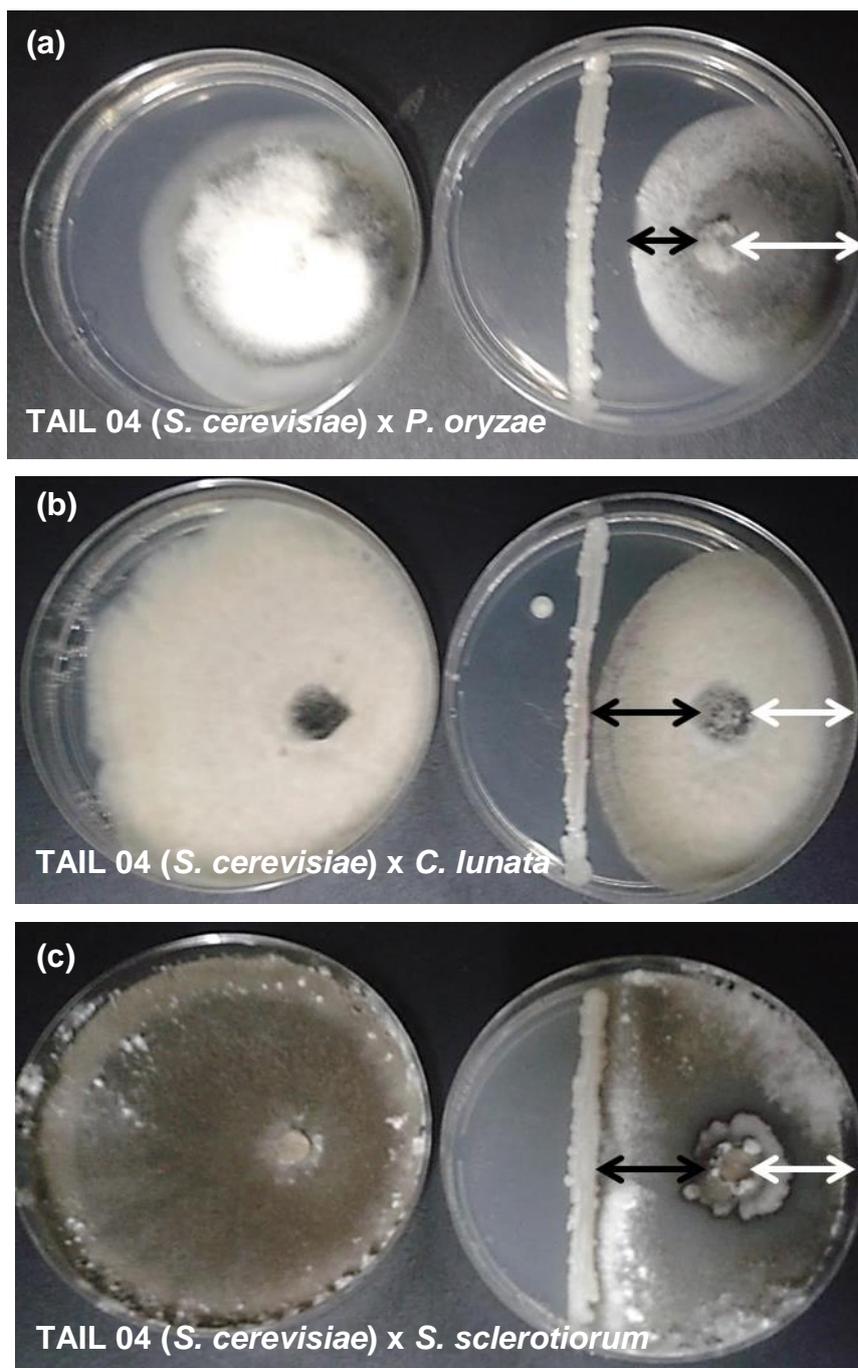


Figura 26 - Inibição do crescimento radial dos fungos (a) *P. oryzae*, (b) *C. lunata* e (c) *S. sclerotiorum* pelo isolado *S. cerevisiae* (TAIL 04). A seta preta indica o crescimento de R2 e a seta branca o crescimento do R1.

Em relação às placas controles (Figura 26), os percentuais de inibição foram consideráveis com 50,17%, 60,75% e 52,00% para os fungos *P. oryzae*, *C. lunata* e *S. sclerotium*, nesta ordem.

A espécie *S. cerevisiae* tem se mostrado eficaz no controle de fungos fitopatógenos o que também foi constatado neste trabalho. Jones e Prusky (2002) observaram que transformantes da levedura *S. cerevisiae* foram capazes de inibir completamente o crescimento fúngico de *Colletotrichum coccodes* (Wallr.) S. J. Hughes e a subsequente diminuição do desenvolvimento de esporos germinados em frutos de tomate. O modo de ação se deu pela expressão do peptídeo lítico cecropina A, peptídeo antifúngico que age sobre a membrana do patógeno alvo, resultando na sua inibição. Do mesmo modo, Parafati et al. (2015) analisando a atividade de biocontrole de leveduras, apresentou *S. cerevisiae* como capaz de inibir o crescimento do fungo patogênico *Botrytis cinerea* após 9 dias de incubação e como produtora de compostos orgânicos voláteis (VOCs) que reduziram o crescimento do fungo sobre condições ácidas.

A produção de compostos orgânicos voláteis (VOCs) também foi observada pela levedura *S. pararoseus*, isolada por Huang et al. (2012) de folhas saudáveis de morango, que inibiu tanto a germinação conidial quanto o crescimento micelial de *B. cinerea* no meio ágar e suprimiu a doença do mofo cinzento em morango. Dentre os compostos produzidos 2-etil-1-hexanol mostrou efeito na supressão da germinação dos conídios e do crescimento micelial de *B. cinerea*, podendo ser um dos componentes responsáveis pela supressão do fungo (HUANG et al., 2012). *S. pararoseus*, isolada de frutos de nectarina, também se mostrou eficaz no biocontrole de infecções originadas de feridas por *Monilinia fructicola* que causa a podridão parda em frutas de caroço (JANISIEWICZ, et al. 2010). No presente trabalho, o isolado *S. pararoseus* (TAIL 66) inibiu o crescimento radial do fungo *P. oryzae* em 22,24% ($\pm 2,78$) (Tabela 8) no meio de cultura ágar, reduzindo o desenvolvimento do fungo em 42,33% em relação a placa controle (Figura 27a).

O isolado *H. sinensis* (TAIL 95) também inibiu o crescimento radial do fungo *P. oryzae* em 1,22% ($\pm 0,18$) (Tabela 8), correspondendo a inibição de 26,52% comparado ao controle (Figura 27 b), sendo considerado o menos eficaz no antagonismo *in vitro*. Nutarat et al. (2015) isolaram a espécie *H. sinensis* de folhas de arroz e não mostrou produção de compostos voláteis antifúngicos nem antagonismo *in vitro* em um meio sólido.

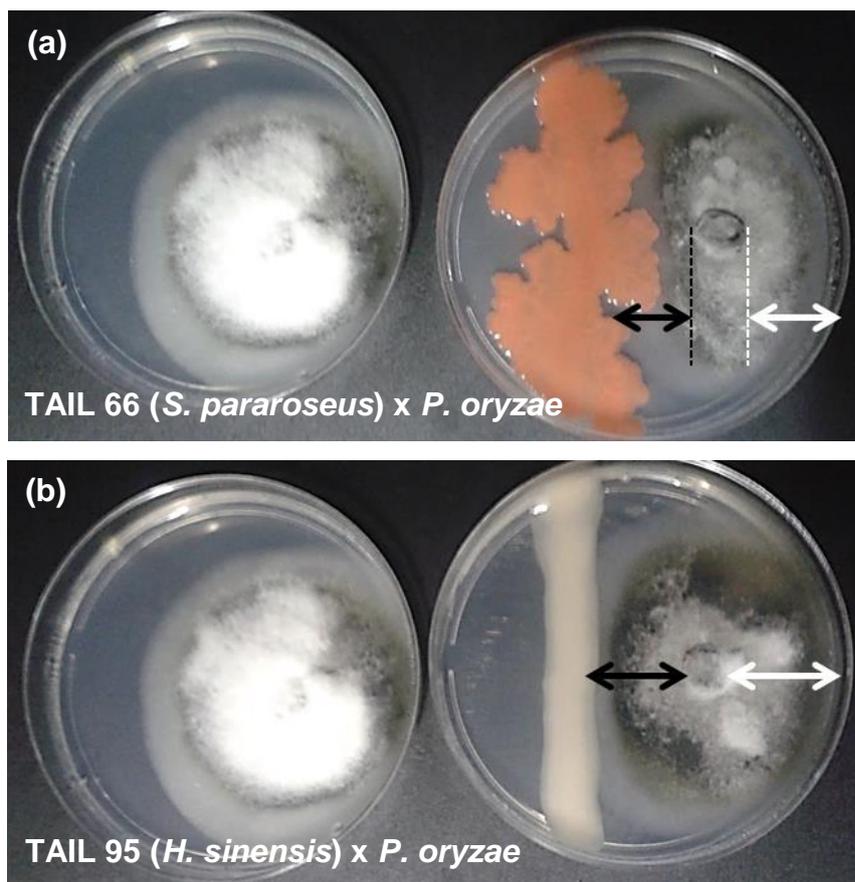


Figura 27 - Inibição do crescimento radial do fungo *P. oryzae* com o isolado (a) *S. pararoseus* (TAIL 66) e (b) *H. sinensis* (TAIL 95). A seta vermelha indica o crescimento de R2 e a seta preta o crescimento do R1.

Não houve efeito antagonista dos isolados *S. pararoseus* (TAIL 66) e *H. sinensis* (TAIL 95) para os fungos *Alternaria sp.*, *C. lunata*, *S. sclerotiorum* e *Didymella sp.* ocorrendo o contato entre e sobre o antagonista e o fungo e apresentando, ao final de 10 dias, percentual de inibição do crescimento radial (PIRG) negativo. Resultados semelhantes foram observados por Fokkema (1973) que ao avaliar o efeito antagonista de isolados de *Sporobolomyces roseus* sobre *Drechslera sorokiniana*, houve o contato entre as colônias ou até mesmo *Drechslera sorokiniana* cobrindo a levedura, o que resultou em valor negativo entre as colônias.

Os fungos fitopatogênicos, *Fusarium sp.*, *Macrophomina sp.* e *R. solani* não sofreram nenhum efeito antagonista dos isolados de leveduras associados tiveram comportamentos agressivos no desenvolvimento, ultrapassando os isolados, e tomando totalmente a placa. O fungo *R. solani* com o isolado *P. antarctica* (TAIL 63) não apresentou valor de PIRG positivo, mas também não ultrapassou a barreira de

crescimento do isolado, inibindo em 50,1% comparado a placa controle (Figura 28). Neste contexto, Pantelides et al. (2015) observaram que leveduras epifíticas *Hanseniaspora uvarum*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Pseudozyma aphidis*, obtidas de bagas de uvas pertencentes as cultivares "Cabernet sauvignon" e "Maratheftiko", do distrito de Limassol – Cyprus, não foram capazes de induzir atividade antiesporulante para o fungo *Aspergillus tubingensis*.



Figura 28 - Inibição do crescimento radial do fungo *R. solani* com o isolado *P. antarctica* (TAIL 63).

Mesmo que o crescimento radial fúngico não tenha sido inibido pelos isolados de leveduras, quando comparados com a placa controle houve uma redução no crescimento micelial dos fungos *Alternaria sp.* e *C. lunata* com os isolados *S. pararoseus* (TAIL 66) e *H. sinensis* (TAIL 95) e *Didymella sp.*, com o isolado *S. cerevisiae* (TAIL 04) (Figura 29). Resultado semelhante também foi observado por Platania et al. (2012) no crescimento micelial do fungo *Penicillium digitatum* em meio sólido com as leveduras *S. cerevisiae* e *W. anomalus* comparados ao controle. Tal redução do halo de crescimento dos fungos pode estar relacionada à competição entre isolados de leveduras e fungos por espaço e nutrientes (SHARMA et al., 2008).

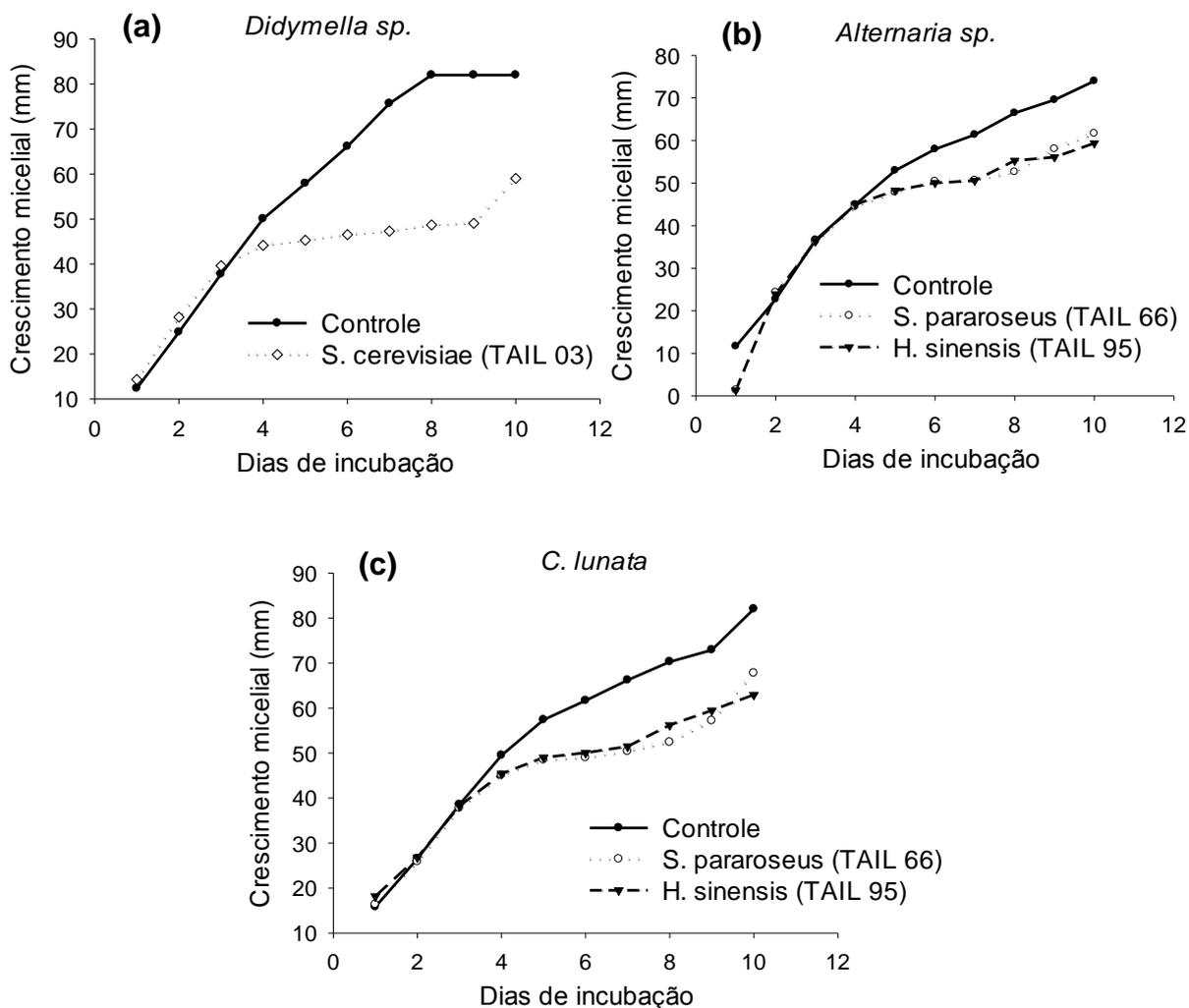


Figura 29 - Crescimento micelial dos fungos **(a)** *Didymella sp.*, **(b)** *Alternaria sp.* e **(c)** *C. lunata* com os isolados *S. cerevisiae* (TAIL 04), *S. pararoseus* (TAIL 66) e *H. sinensis* (TAIL 95) comparado às placas controle.

A atividade antagonista dos isolados de leveduras endofíticas e epifíticas para fungos fitopatogênicos podem estar relacionadas à competição por espaço e de nutrientes, parasitismo direto, além da produção de metabólitos secundários antifúngicos voláteis que influenciam diretamente no desenvolvimento micelial e de enzimas líticas, que ajudam na degradação da parede celular dos fungos patogênicos (SHARMA et al., 2009; LIU et al., 2013; NUTARATAT et al., 2015).

Na inibição do fungo *S. sclerotiorum* e *Didymella sp.* com isolado *P. antarctica* (TAIL 63), notou-se a formação de um halo de inibição (Figura 30), ou seja, não houve contato entre o fungo e a levedura, o que pode ser considerado que a levedura agiu por antibiose sobre o fungo. Machado; Betiol (2012) estudando a

inibição do crescimento micelial de *B. cinerea* por *S. pararoseus* *in vitro*, indicaram que a inibição do crescimento micelial do fungo sem a formação do halo com o antagonista sugere a competição de espaço como modo de ação mais provável sobre o fitopatógeno, o que também pode ter acontecido no presente trabalho nas placas de *P. oryzae* com *H. sinensis* (TAIL 95) (Figura 27b) e de *S. sclerotiorum* com *S. cerevisiae* (TAIL 04) (Figura 26b).

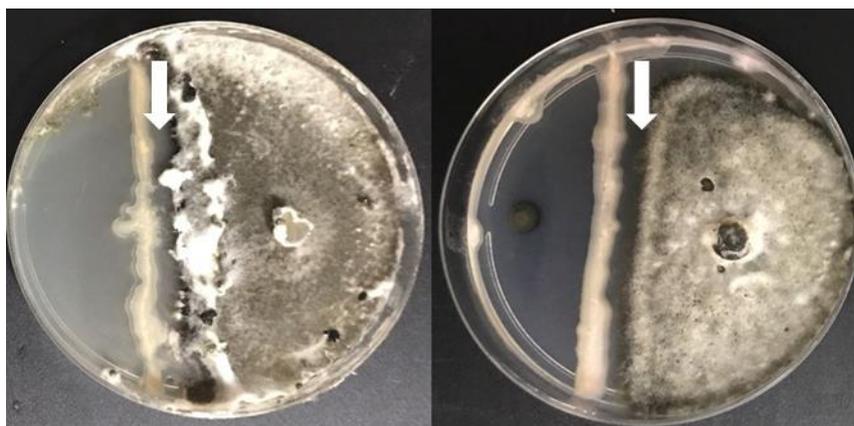


Figura 30 - Formação do halo entre o isolado de levedura *Pseudozyma antarctica* (TAIL 63) e os fungos **(a)** *S. sclerotiorum* e **(b)** *Didymella* após 10 dias de incubação. A seta branca indica o halo formado.

Apesar da boa atividade antagonística *in vitro* apresentada, principalmente, pelos isolados *S. cerevisiae* (TAIL 04) e *P. antarctica* (TAIL 63) são necessários testes *in vivo* para sua comprovação e testes mais específicos para confirmar seus modos de ação no antagonismo.

4.4 Produção de ácido indolacético por isolados de leveduras

A estimativa da concentração de AIA foi calculada pela equação gerada na curva padrão do ácido indolacético (AIA) comercial ($y = 0,0515x - 0,0599$), com $R^2=0,996$. A concentração de AIA foi determinada após 7 dias de incubação (Tabela 9). Os resultados foram obtidos por métodos colorimétricos após a reação com o reagente Salkowski (Figura 31).

Tabela 9 - Concentração de AIA ($\mu\text{g/mL}$) produzido pelas leveduras associadas obtidas de frutos e folhas de melancia após o período de 7 dias de incubação a temperatura de 30 °C sob agitação em shaker a 150 rpm.

Isolados	Concentração de AIA ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (TAIL 04)	21,14 ($\pm 0,0677$) a
<i>Saccharomyces pararoseus</i> (TAIL 66)	7,79 ($\pm 0,0447$) c
<i>Hannaella sinensis</i> (TAIL 95)	3,45 ($\pm 0,0160$) c
<i>Pseudozyma antarctica</i> (TAIL 63)	15,79 ($\pm 0,0605$) b

*Médias seguidas pelas mesmas letras não difere estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

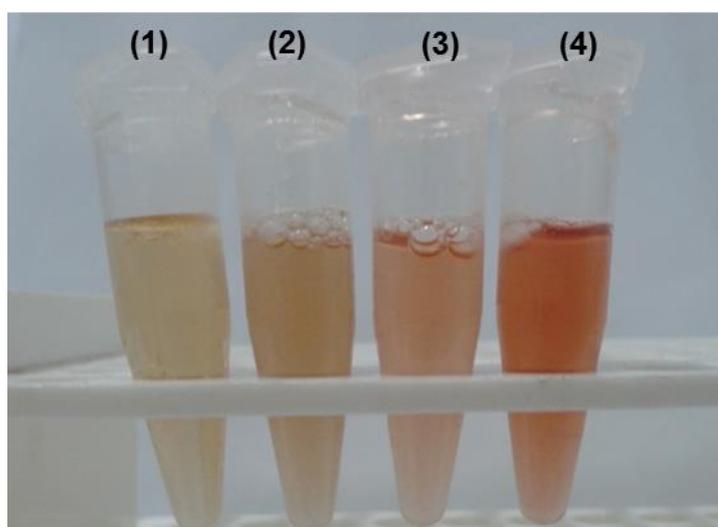


Figura 31 - Reação colorimétrica do sobrenadante dos isolados de leveduras associadas obtidas de frutos e folhas de melancia com o reagente Salkowski após incubação de 30 minutos. A coloração rósea indica a produção de AIA.

(1) *H. sinensis* (TAIL 95), (2) *S. pararoseus* (TAIL 66), (3) *P. antarctica* (TAIL 63) e (4) *S. cerevisiae* (TAIL 04).

As maiores concentrações de AIA foram obtidas pelos isolados *S. cerevisiae* (TAIL 04) com 21,14 ($\pm 0,0677$) $\mu\text{g/mL}$ e *P. antarctica* (TAIL 63) com 15,79 ($\pm 0,0605$) $\mu\text{g/mL}$. Os isolados *S. pararoseus* (TAIL 66) e *H. sinensis* (TAIL 95) não apresentaram diferença significativa na produção com 7,79 ($\pm 0,0447$) $\mu\text{g/mL}$ e 3,45 ($\pm 0,0160$) $\mu\text{g/mL}$ de AIA, respectivamente (Tabela 9). Neste contexto, *S. cerevisiae* também foi avaliada por Wang et al. (2016b) com produção de AIA equivalente próxima de 20 $\mu\text{g/mL}$ e com indução de produção de auxina exógena em mudas de *Arabidopsis thaliana* (*arabidopsis*) tratadas com a levedura.

Nutarat *et al.* (2015) avaliaram isolados endofíticos e epifíticos de folhas de cana-de-açúcar e classificaram a espécie *H. sinensis* com atividade produtora de AIA de 7,1 mg/g de peso seco e isolados de *P. antarctica* com baixa atividade (1,5 mg/g e 1,2 mg/g de peso seco). A levedura *S. pararoses* não tem sido relatada na literatura como produtora de AIA, no entanto, outras leveduras do gênero *Sporidiobolus sp.*, as espécies *S. ruineniae* e *S. euieneniae* apresentaram produção de AIA com 16,6 mg/L e com 84,3 mg/L, respectivamente, conforme observado por Limtong; Koowadjanakul (2012) e por Limtong *et al.* (2014). Desse modo, foi aproximadamente 2 e 10 vezes superior ao que encontramos para *S. pararoseus*, o que pode estar associado na incapacidade de produção de AIA pelo isolado obtido.

Resultados obtidos neste trabalho corroboram com os obtidos por Nassar *et al.* (2005), em que a eficiência na produção de AIA de leveduras endofíticas de raízes de milho em meio líquido glucose-peptona (GPB) na presença de L-triptofano variou conforme os diferentes isolados. A espécie *Williopsis saturnus*, com produção de 22,51 µg/mL enquanto a espécie *Rhodotorula glutinis* não foi produtora de AIA. O triptofano, aminoácido, tem sido identificado como o principal precursor da via de biossíntese do AIA na maioria dos organismos (SPAEPEN *et al.*, 2007).

Já os isolados de leveduras do filoplano de folhas de plantas desconhecidas da Tailândia apresentaram valores consideravelmente superiores de produção de ácido indolacético para *Candida sp.*, variando de 25,7 µg/mL para *Candida glabrata* a 324,4 µg/mL para *Candida maltosa* (LIMTONG; KOOWADJANAKUL, 2012). Wang *et al.* (2016b) avaliando isolados de leveduras do filoplano de *Arabidopsis thaliana* apresentaram valores de produção de AIA na presença de triptofano de 11,48 µg/mL para *Taphrina sp.* a 41,4 µg/mL para *Dioszegia sp.*

Variações entre espécies de um mesmo gênero e entre estirpes de uma mesma espécie como produtoras e não produtoras de AIA indicam que as diferenças da capacidade de produção de AIA dependem da estirpe de levedura (LIMTONG; KOOWADJANAKUL, 2012). SUN *et al.* (2014) mostraram que a produção de AIA pode ser influenciada pelo pH do meio e pela temperatura de incubação, indicando uma produção melhor em um ambiente acidificado comparado ao neutro e uma temperatura ótima de 28°C.

Assim como na atividade antagonística, os isolados mais promissores para a produção de AIA foram *S. cerevisiae* (TAIL 04) e *P. antarctica* (TAIL 63), mas para

comprovar sua efetividade torna-se importante a aplicação *in vivo* para a análise do AIA na promoção do crescimento da planta.

Considerando as características de biocontrole e produção do fitormônio AIA identificadas nos isolados no presente trabalho, *S. cerevisiae* (TAIL 04) e *P. antarctica* (TAIL 63) tornam-se relevantes para a sua bioprodução. Mais estudos são necessários para comprovar seus modos de ação e efeitos sobre fitopatógenos e plantas, e então possibilitar o uso desses inoculantes microbianos como biofertilizantes, reforçadores de plantas, fitostimuladores e/ou biopesticidas.

5 CONCLUSÕES

O microbioma presente na melancia pode diversificar conforme o procedimento de isolamento adotado e o nicho estudado. A diversidade de microrganismos é maior nas folhas do que nos frutos de melancia. A comunidade de bactérias endofíticas e associadas, comum aos nichos, é representada pelo gênero *Pantoea*, e os gêneros representantes nas folhas são *Rhizobium*, *Microbacterium*, *Pantoea*, *Sphingomonas* e *Curtobacterium*, isolados dos procedimentos de fragmentação e maceração.

As espécies de leveduras *S. pararoseus*, *P. aphidis*, *H. sinensis* e *B. albus* foram isoladas pela primeira vez de melancias, sendo *S. pararoseus* endofítica do fruto e da folha e *P. aphidis* endofítica da folha. As outras espécies foram classificadas como associadas e estão presentes nas folhas da melancia e a espécie *S. cerevisiae* está associada aos frutos.

Os isolados de leveduras *S. cerevisiae* (TAIL 04) e *P. antarctica* (TAIL 63) foram eficientes na inibição do crescimento *in vitro* dos fungos fitopatogênicos *S. sclerotiorum*, *P. oryzae*, *Alternaria* sp., *C. lunata* e *Didymella* sp. e apresentaram capacidade de produzir de ácido indolacético (AIA) pelo teste colorimétrico, indicando-os como potenciais inoculantes para aplicações biotecnológicas.

6 REFERÊNCIAS

- ALBORN, H.T. et al. An elicitor of plant volatiles from beet armyworm oral secretion. **SCIENCE**, v. 276, p. 945-949, 1997.
- AKELLO, J. et al. *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin as an endophyte in tissue culture banana (*Musa* spp.). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 96, p. 34-42, 2007.
- ANDREOTE, F. D.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 417-432, 2009.
- ANDREWS, J. H. Future research directions in phyllosphere ecology. In: Microbial ecology of leaves. Brock/Springer Series in Contemporary Bioscience. **Springer New York**, p. 467-479, 1991.
- ARAÚJO, et al. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, v.47, p. 229–236, 2001.
- ARAÚJO, et al. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 10, p. 4906–4914, 2002.
- AZEVEDO, J.L. et al. Isolamento de micro-organismos endofíticos. Parte II – Aspectos Práticos. In: ARAÚJO, W.L. et al. **Micro-organismos endofíticos: aspectos teóricos e práticos de isolamento e caracterização**. Santarém: UFOPA, p.142-153, 2014.
- AZEVEDO, J.L. et al. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. Review article. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 40-65, 2000.
- AZEVEDO, J.L. de. Microorganismos endofíticos. In: MELO, I.S. de; AZEVEDO, J.L. de. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998.
- BACON, C.W.; HINTON, D.M. Bacterial endophytes: the endophytic niche, its occupants, and its utility. In: Plant-associated bacteria. **Springer Netherlands**, p. 155-194, 2007.
- BAFFI, M.A. et al. Isolation and molecular identification of wine yeasts from a Brazilian vineyard. **Annals Microbiology**, v.61, p. 75-78, 2011.
- BAI, Y. et al. Isolation of plant-growth-promoting *Bacillus* strains from soybean root nodules. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 230-238, 2002.

BARRETO, H. F. M. et al. Revisão Bibliográfica. Uso de coprodutos de frutas tropicais na alimentação de ovinos no Semiárido do Brasil. **Archivos de Zootecnia**, 2014. v. 63, n. 241, p. 117-131.

BENEDUZI, A. et al. Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 63, p. 94-104, 2013.

BENHAMOU, N.; BE´LANGER, R. R. Benzothiadiazole-mediated induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato. **Plant Physiology**, v. 118, p. 1203-1212, 1998.

BERLEC, A. Novel techniques and findings in the study of plant microbiota: Search for plant probiotics. Review. **Plant Science**, v. 193-194, p. 96-102, 2012.

BETTIOL, W et al. Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas. Jaguariúna, SP: **Embrapa Meio Ambiente**, 155p, 2012.

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

BOUNDY-MILLS, K. Methods for investigating yeast biodiversity. Chapter 5. The yeast handbook. In: ROSA, C.; PÉTER, G. **Biodiversity and Ecophysiology of yeasts**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 67-100, 2006.

BREUSEGEM, F,V. et al. The role of active oxygen species in plant signal transduction. Review. **Plant Science**, v. 161, p. 405-414, 2001.

BRYSCH-HERZBERG, M.; SEIDEL, M. Yeast diversity on grapes in two German wine growing regions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 214, p. 137-144, 2015.

BUFFERRY, C. Reacción en cadena de la polimerasa. Capítulo 3. In: WALTER, J. M.; GINGOLD, E. B. **Biología molecular y biotecnología**. 2 ed. Zaragoza: Editorial Acribia, S.A., 1997.

BULGARELLI, D. et al. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. **Annual review of plant biology**, v. 64, p. 807-838, 2013.

BUONAURIO, R. et al. *Sphingomonas melonis* sp. nov., a novel pathogen that causes brown spots on yellow Spanish melon fruits. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 52, n. 6, p. 2081-2087, 2002.

BUXDORF, K. et al. The epiphytic fungus *Pseudozyma aphidis* induces jasmonic acid-and salicylic acid/nonexpressor of PR1-independent local and systemic resistance. **Plant physiology**, v. 161, n. 4, p. 2014-2022, 2013.

CAMATTI-SARTORI, V. et al. Endophytic yeasts and filamentous fungi associated with southern Brazilian apple (*Malus domestica*) orchards subjected to conventional,

integrated or organic cultivation. **Journal Basic Microbiology**, v. 45, n. 5, p. 397-402, 2005.

CHEN, Y. et al. The application of phosphate solubilizing endophyte *Pantoea dispersa* triggers the microbial community in red acidic soil. **Applied Soil Ecology**, v. 84, p. 235-244, 2014.

CHIARINI, L. et al. *Burkholderia cepacia* complex species: health hazards and biotechnological potential. **Trends in microbiology**, v. 14, n. 6, p. 277-286, 2006.

COMPANT, S. et al. Endophytes of grapevine flowers, berries, and seeds: identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization. **Microbial Ecology**, v. 62, p.188-197, 2011.

DELÉTOILE, A. et al. Phylogeny and identification of *Pantoea* species and typing of *pantoea agglomerans* strains by multilocus gene sequencing. **Journal of clinical microbiology**, v. 47, n.2, p. 300–310, 2009.

DEUS, E. **Produção de melancia continua em expansão no Tocantins**. Disponível em: <<http://seagro.to.gov.br/noticia/2016/8/15/producao-de-melancia-continua-em-expansao-no-tocantins/#sthash.eFMskIDp.dpuf>>. Acesso em: 23 fev. 2017.

DIAS, R.C.S.; REZENDE, G.M. Socioeconomia. Sistemas de produção da melancia. **Embrapa Semiárido**: Sistemas de produção, 2010. Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Melancia/SistemaProducaoMelancia/socioeconomia.htm>>. Acesso em: 24 fev. 2017.

DIAS, A. C. F. Caracterização molecular de comunidades microbianas por técnicas independentes de cultivo. In: ARAÚJO, W.L. et al. **Micro-organismos endofíticos: aspectos teóricos e práticos de isolamento e caracterização**. Santarém: UFOPA, 2014.

DUTKIEWICZ, J. et al. *Pantoea agglomerans*: a mysterious bacterium of evil and good. Part III. Deleterious effects: infections of humans, animals and plants. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 23, n. 2, 2016.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. A cultura da melancia. Embrapa Meio-Norte – 2. ed. revista e ampliada. Coleção Plantar, 57. 85 p. Brasília, DF: **Embrapa Informação Tecnológica**, 2007.

ETESAMI, H.; ALIKHANI, H. A. Suppression of the fungal pathogen *Magnaporthe grisea* by *Stenotrophomonas maltophilia*, a seed-borne rice (*Oryza sativa* L.) endophytic bacterium. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 62, n. 9, p. 1271-1284, 2016.

FARIA, N. T. et al. Direct xylan conversion into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by *Pseudozyma antarctica* PYCC 5048T. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 71, p. 58-65, 2015.

- FARIA, N. T. et al. Production of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, from pentoses and D-glucose/D-xylose mixtures by *Pseudozyma* yeast strains. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 11, p. 1790-1799, 2014.
- FELL, J. W. et al. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 1351-1371, 2000.
- FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 3. ed. revista e ampliada. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2007.
- FISH, W. W.; BRUTON, B. D.; RUSSO, V. M. Watermelon juice: a promising feedstock supplement, diluent, and nitrogen supplement for ethanol biofuel production. **Biotechnology for biofuels**, v. 2, n. 1, p. 1-9, 2009.
- FOKKEMA, N.J. Antagonism between fungal saprophytes and pathogens on aerial plant surfaces. In: DICKINSON, C.H., PREECE, T.F. (Eds.), *Microbiology of Aerial Plant Surfaces*. **Academic Press**, London, p. 487–505, 1976.
- FOKKEMA, N.J. The role of saprophytic fungi in antagonism against *Drechslera sorokiniana* (*Helminthosporium sativum*) on agar plates and on rye leaves with pollen. **Physiological Plant Pathology**, v. 3, p. 195-205, 1973.
- FUNGARO, M.H.P. PCR na micologia. **Biociência**, v.14, p.12-16, 2000.
- GAI, C. S. et al. Diversity of endophytic yeasts from sweet Orange and their localization by scanning electron microscopy. **Journal of Basic Microbiology**, n. 49, p. 441-451, 2009.
- GLASSNER, H. et al. Characterization of endophytic bacteria from cucurbit fruits with potential benefits to agriculture in melons (*Cucumis melo* L.). **FEMS Microbiology Ecology**, v. 91, n. 7, 2015.
- GLICKMANN, E.; DESSAUX, Y. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. **Applied and environmental microbiology**, v. 61, n. 2, p. 793-796, 1995.
- GOMES, R.P. **Fruticultura brasileira**. São Paulo: Nobel, 1972.
- GRONDIN, E. et al. A comparative study on the potential of epiphytic yeasts isolated from tropical fruits to produce flavoring compounds. **International journal of food microbiology**, v. 203, p. 101-108, 2015.
- GRUBBEN, G.J.H.; DENTON, O.A. *Citrullus Lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai. 2. Vegetables. **Plant resources of tropical Africa**. PROTA Foundation. Wageningen, Netherlands/Backhuys Publishers Leiden, Netherlands/CTA, 2004.

HARDOIM, P. R. et al. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 79, n. 3, p. 293-320, 2015.

HERRERA, S.D. et al. Wheat seeds harbour bacterial endophytes with potential as plant growth promoters and biocontrol agents of *Fusarium graminearum*. **Microbiological Research**, v. 186-187, p. 37-43, 2016.

HUANG, R. et al. Evaluation of *Sporidiobolus pararoseus* strain YCXT3 as biocontrol agent of *Botrytis cinerea* on post-harvest strawberry fruits. **Biological Control**, v. 62, p. 53–63, 2012.

IKEDA, A.C. et al. Morphological and genetic characterization of endophytic bacteria isolated from roots of different maize genotypes. **Microbial Ecology**, v.65, p.154-160, 2013.

INSTITUTO BASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTÍSTICA – IBGE. **Produção Agrícola Municipal**. Culturas temporárias e permanentes. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Volume 40, 2013.

INSTITUTO BASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTÍSTICA – IBGE. **Produção agrícola municipal: culturas temporárias e permanentes**. Rio de Janeiro: IBGE, v. 42, p.1-57, 2015a.

INSTITUTO BASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTÍSTICA – IBGE. **Lavoura temporária**. Estados @. Tocantins. 2015b. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=to&tema=lavouratemporaria2015>>. Acesso em: 27 de fev de 2017.

INSTITUTO BASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTÍSTICA – IBGE. **Produção Agrícola Municipal – lavoura temporária**. Cidades@. Formoso do Araguaia. 2015c. Disponível em: <<http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/temas.php?lang=&codmun=170820&idtema=158&search=tocantins|formoso-do-araguaia|producao-agricola-municipal-lavoura-temporaria-2015>>. Acesso em: 27 de fev de 2017.

ISAEVA, O.V. et al. Endophytic yeast fungi in plant storage tissues. **Biology Bulletin**, v. 37, n. 1, p. 26-34, 2010.

JANISIEWICZ, W.J.; KURTZMAN, C.P.; BUYES, J.S. Yeasts associated with nectarines and their potential for biological control of brown rot. **Yeast**, v. 27: 389-398, 2010.

JONES, R.W.; PRUSKY, D. Expression of an antifungal peptide in *Saccharomyces*: a new approach for biological control of the postharvest disease caused by *Colletotrichum coccodes*. **Biological control**, v. 92, n. 1, p. 33-37, 2002.

KAEWKLA, O.; FRANCO C.M.M. Rational approaches to improving the isolation of endophytic actinobacteria from Australian native trees. **Microbial Ecology**, v. 65, p. 384-393, 2013.

KEARSE, M. et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, 1647-1649.

KHALAF, E. M.; RAIZADA, M. N. Taxonomic and functional diversity of cultured seed associated microbes of the cucurbit family. **BMC microbiology**, v. 16, n. 1, p. 131, 2016.

KHAN, A. L. et al. Bacterial endophyte *Sphingomonas* sp. LK11 produces gibberellins and IAA and promotes tomato plant growth. **Journal of Microbiology**, v. 52, n. 8, p. 689-695, 2014.

KLOPPER, J.W., et al. Symptoms of Fern Distortion Syndrome Resulting from Inoculation with Opportunistic Endophytic Fluorescent *Pseudomonas* spp. **PLOS ONE**, v. 8, n.3, p. 1-16, 2013.

KOIWA, H.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M. Regulation of protease inhibitors and plant defense. **Trends in Plant Science**, v. 2, n. 10, p. 379-384, 1997.

KUKLA, M.; PLOCINICZAK, T.; PIOTROWSKA-SEGET, Z. Diversity of endophytic bacteria in *Lolium perenne* and their potential to degrade petroleum hydrocarbons and promote plant growth. **Chemosphere**, v. 117, p. 40-46, 2014.

KURTZMAN, C. P. et al. Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. **The yeasts, a taxonomic study**, 5th edn. Chapter 7. Elsevier, Amsterdam, p. 87-110, 2011.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W.; BOEKHOUT, T. Gene sequence analyses and other DNA-based methods for yeast species recognition. Chapter 10. **The Yeasts, a Taxonomic Study**. Elsevier, v. 1, p. 137-144, 2011.

KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 73, n. 4, p. 331-371, 1998.

KURTZMAN, C.P.; ROBNETT, C.J. Phylogenetic relationships among yeasts of the 'Saccharomyces complex' determined from multigene sequence analyses. **FEMS Yeast Research**, v.3, p. 417-432, 2003.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (eds). **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. John Wiley & Sons: Chichester, England, p 115-147, 1991.

LANE, D. J. et al. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 82, n. 20, p. 6955-6959, 1985.

LAWRENCE, P.K.; KOUNDAL, K. R. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. **EJB Electronic Journal of Biotechnology**, v.5. n.1, p. 93-109, 2002.

LEVEAU, J. J.; LINDOW, S. E. Appetite of an epiphyte: Quantitative monitoring of bacterial sugar consumption in the phyllosphere. **PNAS**, v. 98, n. 6, 2001.

LIMTONG, S. et al. Diversity of culturable yeasts in phylloplane of sugarcane in Thailand and their capability to produce indole-3-acetic acid. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 6, p. 1785-1796, 2014.

LIMTONG, S.; KOOWADJANAKUL, N. Yeasts from phylloplane and their capability to produce indole-3-acetic acid. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 3323-3335, 2012.

LINDOW, S. E.; BRANDL, M. T. Microbiology of the phyllosphere. **Applied and environmental microbiology**, v. 69, n. 4, p. 1875-1883, 2003.

LINDOW, S. E.; LEVEAU, J.H.J. Phyllosphere microbiology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 3, p. 238-243, 2002.

LIPKE, H.; FRAENKEL, G. S.; LIENER, I. E. Growth inhibitors. Effects of soybean inhibitors on growth of *Tribolium Confusum*. **Agricultural and food chemistry**, v. 2, n. 8, 1954.

LIU, Y. et al. Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. **The Plant Journal**, v. 8, n. 3, p. 457-463, 1995.

LIU, Y. et al. Phylogenetic diversity of the bacillus pumilus group and the marine ecotype revealed by multilocus sequence analysis. **PLOS ONE**, v. 8, n. 11, p. 1-11, 2013.

LIU, Y et al. Isolation, identification and in vitro screening of Chongqing orangery yeasts for the biocontrol of *Penicillium digitatum* on citrus fruit. **Biological Control**, v. 110, p. 18-24, 2017.

LODEWYCKX, C. Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 21, n. 6, p. 583-606, 2002.

LUGTENBERG, B. J. J.; CARADUS, J. R.; JOHNSON, L. J. Fungal endophytes for sustainable crop production. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 92, n. 12, 2016.

MACARISIN, D. et al. Superoxide anion and hydrogen peroxide in the yeast antagonist-fruit interaction: A new role for reactive oxygen species in postharvest biocontrol? **Postharvest Biology and Technology**, v. 58, p. 194 -202, 2010.

MACHADO, M.A.C.F.; BETTIOL, W. Potencial para o biocontrole de *Botrytis cinerea* por leveduras em sistema integrado de cultivo de lírio. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 45, n. 6, p. 539-545, 2010.

MARTINS, M. K. et al. Aspectos teóricos da caracterização molecular de micro-organismos. In: ARAÚJO, W.L. et al. **Micro-organismos endofíticos: aspectos teóricos e práticos de isolamento e caracterização**. Santarém: UFOPA, 2014.

- MASSA, N. M. L. et al. Concentrado de melancia (*Citrullus vulgaris* Schrad): aceitação sensorial, parâmetros microbiológicos, físico-químicos e determinação de fitonutrientes. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 32, n. 1, 2014.
- MATIC, S. et al. Antagonistic yeasts and thermotherapy as seed treatments to control *Fusarium fujikuroi* on rice. **Biological Control**, v. 73, p. 59-67, 2014.
- MCINROY, J.A.; KLOEPPER, J.W. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. **Plant and Soil**, v. 173, p. 337-342, 1995.
- MULET, M.; LALUCAT, J.; GARCÍA-VALDÉS, E. DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 6, p. 1513–1530, 2010.
- MONNERAT, R. G. et al. Selection of *Bacillus thuringiensis* strains toxic against cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae). **BioAssay**, v. 5, 2010.
- MULVANY, J.G. Membrane filter techniques in microbiology. Chapter VII. In: NORRIS, J.R.; RIBBONS, D.W. Methods in microbiology, v. 1. **Academic Press**. London and New York, 1969.
- NASANIT, R.; KRATAITHONG, K.; TANTIRUNGKIJ, M.; LIMTONG, S. Assessment of epiphytic yeast diversity in rice (*Oryza sativa*) phyllosphere in Thailand by a culture-independent approach. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 107, n. 6, p. 1475-1490, 2015.
- NASSAR, A. H.; EL-TARABILY, K. A.; SIVASITHAMPARAM, K. 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**, v. 42, n. 2, p. 97-108, 2005.
- NUTARAT, P.; SRISUK, N.; ARUNRATTIYAKORN, P.; LIMTONG, S. Plant growth-promoting traits of epiphytic and endophytic yeasts isolated from rice and sugar cane leaves in Thailand. **Fungal biology**, v. 118, n. 8, p. 683-694, 2014.
- ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A ALIMENTAÇÃO E A AGRICULTURA - FAO. **Watermelon**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em: 27 de fev de 2017.
- PANNETIER, C. et al. Introduction of new traits into cotton through genetic engineering: insect resistance as example. **Euphytica**, v. 96, p. 163-166, 1997.
- PANTELIDES, I. S. et al. Isolation, identification and *in vitro* screening of grapevine yeasts for the control of black aspergilli on grapes. **Biological Control**, v. 88, p. 46-53, 2015.
- PEREIRA, A. S. et al. Key factors affecting watermelon yield loss in different growing seasons. **Scientia Horticulturae**, v. 218, p. 205-212, 2017.

PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. In: Microbial ecology of leaves. **Springer New York**, 1991. p. 179-197.

PLATANIA, C. et al. Efficacy of killer yeasts in the biological control of *Penicillium digitatum* on Tarocco orange fruits (*Citrus sinensis*). **Food microbiology**, v. 30, n. 1, p. 219-225, 2012.

PUNJA, Z. K.; UTKHEDE, R. S. Biological control of fungal diseases on vegetable crops with fungi and yeasts. **Mycology series**, v. 21, p. 157-172, 2004.

RICHERT, K.; BRAMBILLA, E.; STACKEBRANDT, E. Development of PCR primers specific for the amplification and direct sequencing of *gyrB* genes from microbacteria, order Actinomycetales. **Journal of Microbiological Methods**, v. 60, p. 115-123, 2005.

RYAN, C. A. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annual review of phytopathology**, v. 28, n. 1, p. 425-449, 1990.

RYAN, R. P. et al. The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. **Nature reviews. Microbiology**, v. 7, n. 7, p. 514, 2009.

SATIVA SEEDS & SERVICES. Crimson Sweet improved. Disponível em: <<http://www.sativa.it/pr206-crimson-sweet-improved/>>. Acesso em: 10 de mar de 2017.

SAUER, M.; ROBERT, S.; KLEINE-VEHN, J. **Review paper Auxin: simply complicated**. Journal of Experimental Botany, 2013. V. 64, n. 9, p. 2565–2577.

SCALES, B. S.; DICKSON, R. P.; LIPUMA, J. J.; HUFFNAGLE, G. B. Microbiology, genomics, and clinical significance of the *Pseudomonas fluorescens* species complex, an unappreciated colonizer of humans. **Clinical microbiology reviews**, v. 27, n. 4, p. 927-948, 2014.

SHARMA, R.R.; DINESH, S.; SINGH, R. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. **Biological control**, v. 50, n. 3, p. 205-221, 2009.

SHOEBITZ, M. et al. Plant growth promoting properties of a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated from Lolium perenne rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, n. 9, p. 1768-1774, 2009.

SILVA, F. de A. S.; AZEVEDO, C. A. V. de. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **African Journal Agricultural Research**, v.11, n.39, p. 3733-3740, 2016.

SOBRAL, J.K. et al. Métodos de isolamento, caracterização, purificação e conservação de micro-organismos endofíticos. In: **Micro-organismos endofíticos: aspectos teóricos e práticos de isolamento e caracterização**. Santarém: UFOPA, 2014.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31, p. 425-448, 2007.

SPADARO, D.; DROBY, S. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. Review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 47, p. 39 e 49, 2016.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. **Science-new york then washington**, v. 260, p. 214-214, 1993.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 67, n.4, p. 491-502, 2003.

STROBEL, G.A. Rainforest endophytes and bioactive products. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 315-333, 2002.

SUN, P. F. et al. Indole-3-acetic acid-producing yeasts in the phyllosphere of the carnivorous plant *Drosera indica* L. **PLOS ONE**, v. 9, n. 12, p. 1-22, 2014.

SZILAGYI-ZECCHIN, V.J. et al. Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. **AMB Express**, v. 4, n. 26, p.1-9, 2014.

TAMURA, D. P. et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using likelihood, distance, and parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, 2011.

TEIXEIRA, M.A. et al. Microrganismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etnovarietades em três estados brasileiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.1, p.43-49, 2007.

TRINDADE, R.C.; RESENDE, M.A.; SILVA, C.M.; ROSA, C.A. Yeasts associated with fresh and frozen pulps of Brazilian tropical fruits. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 25, n. 2, p. 294-300, 2002.

TRISTÃO, G.B. et al. Leveduras associadas a frutos de abacaxi (*Ananas Comosus*) e sua utilização como agentes de controle biológico. **Engenharia Ambiental: Pesquisa e Tecnologia**, v. 9, n. 2, 2012.

TURNER, T. R.; JAMES, E. K.; POOLE, P. S. The plant microbiome. **Genome biology**, v. 14, n. 6, p. 209, 2013.

VALDUGA, E. et al. Carotenoids production from a newly isolated *Sporidiobolus pararoseus* strain using agroindustrial substrates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 207-213, 2014.

- VAN PEER, R.; NIEMANN, G.J.; SCHIPPERS, B. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of Fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. Strain WCS417r. **Phytopathology**, 1991.
- VETROVSKY, T. et al. The rpb2 gene represents a viable alternative molecular marker for the analysis of environmental fungal communities. **Molecular Ecology Resources**, v. 26, p. 388-401, 2016.
- VERMA, V.C.; KHARWARA, R.N. STROBEL, G.A. Chemical and functional diversity of natural products from plant associated endophytic fungi. **Natural Product Communications**, v.4, n. 11, p. 1511-1532, 2009.
- VORHOLT, J. A. Microbial life in the phyllosphere. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 12, p. 828-840, 2012.
- XIA, Y.; BOLT, S.; DREYER, J.; SCOTT, D.; WILLIAMS, M.A. Characterization of culturable bacterial endophytes and their capacity to promote plant growth from plants grown using organic or conventional practices. **Front. Plant Sci.** v. 6, n. 490, 2015.
- XIN, G.; GLAWE, D.; DOTY, S.L. haracterization of three endophytic, indole-3-acetic acid-producing yeasts occurring in *Populus* trees. **Mycological Research**, v. 113, n. 9, p. 973-980, 2009.
- WANG, K.; SPILA, T.P.; OVERMYER, K. The isolation and characterization of resident yeasts from the phylloplane of *Arabidopsis thaliana*. **Scientific Reports**, v. 6, n. 39403, p. 1-13, 2016a.
- WANG, Y. et al. The diversity and potential function of endophytic bacteria isolated from *Kobresia capillifolia* at alpine grasslands on the Tibetan Plateau, China. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 15, n. 9, p. 2153-2162, 2016b.
- WATSON, J. D. et al. Técnicas de Biologia molecular. In: **Biologia molecular do gene**; tradução Luciane Passaglia, Rivo Fisher. – 5 ed. – Porto Alegre: Artmed, p. 658-672, 2006.
- WELBAUM, G. E. Watermelon. hapter 10. Family cucurbitaceae. **Vegetable production and practices**. CABI, p. 156-165, 2014.
- WHIPPS, J.M. et al. Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, n. 6, p. 1744-1755, 2008.
- YAAZH XENOMICS. **26S rRNA sequencing**. Disponível em: <<http://www.yaazhxenomics.com/26s-rRNA-sequencing.php>>. Acesso em: 10 de mar de 2017;