

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA, MATEMÁTICA E EDUCAÇÃO

FERNANDA DE SOUSA COLOMBINI

AVALIAÇÃO DA LEVEDURA RIZOFÉRICA *Torulaspora globosa* COMO INDUTORA  
DE RESISTÊNCIA SISTÊMICA EM MILHO CONTRA O PATÓGENO *Fusarium*  
*verticillioides*

ARARAS

2021

FERNANDA DE SOUSA COLOMBINI

AVALIAÇÃO DA LEVEDURA RIZOFÉRICA *Torulaspóra globosa* COMO INDUTORA  
DE RESISTÊNCIA SISTÊMICA EM MILHO CONTRA O PATÓGENO *Fusarium*  
*verticillioides*

Monografia apresentada ao curso de Licenciatura em  
Ciências Biológicas da Universidade Federal de São  
Carlos para obtenção do título de licenciada em Ciências  
Biológicas.

Orientação Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Márcia Maria Rosa Magri

ARARAS

2021

Fernanda de Sousa Colombini

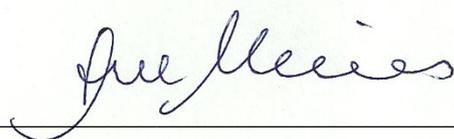
AVALIAÇÃO DA LEVEDURA RIZOFÉRICA *Torulaspora globosa* COMO INDUTORA  
DE RESISTÊNCIA SISTÊMICA EM MILHO CONTRA O PATÓGENO *Fusarium*  
*verticillioides*

Monografia apresentada ao curso de Licenciatura em  
Ciências Biológicas da Universidade Federal de São  
Carlos para obtenção do título de licenciada em Ciências  
Biológicas.

Data da Defesa: 28/06/2021

Resultado: Aprovada

BANCA EXAMINADORA



---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ane Hackbart de Medeiros

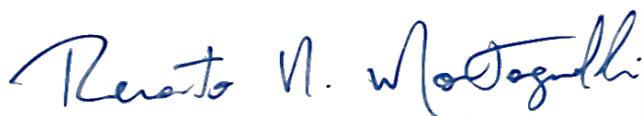
Universidade Federal de São Carlos



---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Maria Rosa Magri

Universidade Federal de São Carlos



---

Prof. Dr. Renato Nallin Montagnolli

Universidade Federal de São Carlos

*Dedico este trabalho aos meu pais, Brasília e  
Fabiano, por sonharem este sonho junto a  
mim e por serem meu suporte e apoio em  
todos os dias de minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me presentear com o dom da vida e por ser minha força e alento quando os obstáculos se fizeram presentes.

Aos meus pais, Brasília e Fabiano, por acreditarem em mim e apoiarem incondicionalmente meu sonho. Sem vocês, eu não chegaria até aqui.

Ao meu irmão Gustavo, por sempre torcer por mim.

Aos meus avós, Braulio, Carmen e Maria Aparecida, por serem a imensidão de amor e carinho que me renovam a cada dia.

Ao Rafael, pela amizade, amor, companheirismo, compreensão e alegria em todas as horas.

Às minhas amigas Carina, Caroline, Gabrielle, Mariana e Vitória, por terem sido minha família em Araras e por cuidarem tão bem de mim durante esses quatro anos. Levarei vocês para sempre em meu coração.

À minha família, amigos e colegas de Batatais, por sempre torcerem por mim.

À Profa. Márcia, por me aceitar como sua aluna e permitir tanto aprendizado sob sua orientação.

À Profa. Sandra, por me acolher e me auxiliar nos momentos de crescimento como aluna.

Ao Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM), aos seus alunos e professores, por me acolherem nos dois últimos anos, dando toda a estrutura, suporte e auxílio.

À Universidade Federal de São Carlos – *campus* Araras, direção, corpo docente, alunos, colegas e demais funcionários, por todo acolhimento e aprendizagem. O respeito e dedicação que vocês depositam para a construção de uma universidade pública, gratuita e de qualidade contribuíram para meu crescimento pessoal, profissional e enriquecimento como ser humano.

À FAPESP, pelo apoio financeiro que possibilitou a execução deste projeto. O investimento em ciência jamais será em vão.

E a *“todos esses que aí estão atravancando meu caminho, eles passarão... Eu passarinho...”* (Mario Quintana).

## RESUMO

Na cultura de milho, um dos vegetais mais consumidos no mundo, utilizam-se numerosas aplicações de agroquímicos para o controle de fitopatógenos que causam danos à saúde humana e ao ambiente. Dentre as principais doenças que afetam a cultura, o fungo *Fusarium verticillioides* é responsável por causar podridão em raiz, colmo e espiga, além de causar danos em grãos armazenados. As plantas, naturalmente expostas a estresses ambientais, apresentam mecanismos de defesa que permanecem inativos ou latentes até serem acionados por condições adversas. Um desses mecanismos é conhecido como Resistência Sistêmica Induzida (RSI). Agentes químicos, como o ácido acetilsalicílico (AAS) ou agentes biológicos, como microrganismos promotores de crescimento vegetal (MPCV) podem ser utilizados para acionar a RSI. Embora diversos trabalhos apresentem as potencialidades da RSI por MPCV, o estudo da ação de leveduras responsáveis por tais mecanismos ainda não está completamente elucidado. Considerando o exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade da levedura rizosférica *Torulaspora globosa* (linhagem 6S01) de acionar a RSI em milho, a fim de promover uma resposta imune ao fitopatógeno *F. verticillioides*. Para tanto, plantas de milho foram cultivadas em vaso, em casa de vegetação, onde receberam os tratamentos (no plantio e a partir de 4 dias após emergência, a cada dois dias, por 11 dias, totalizando 7 aplicações) seguintes: controle (solução salina 0,85%), solução de AAS (100mg/L), células de levedura ( $1 \times 10^5$  células/ml) e metabólitos da levedura (filtrado do meio de cultivo da levedura por 48 horas). Os tratamentos foram aplicados com borrifador (5 ml/planta). Após finalizar a aplicação dos tratamentos, as plantas foram inoculadas com 1ml de suspensão de esporos do patógeno *F. verticillioides* ( $1 \times 10^6$  esporos/ml). Dez dias após a inoculação do fungo, as plantas foram analisadas quanto ao grau de severidade dos sintomas de podridão, desenvolvimento do vegetal e atividade de enzimas relacionadas ao sistema de defesa das plantas. Os resultados mostram que, com a aplicação de células da levedura *T. globosa*, houve a indução de resistência sistêmica nas plantas de milho, de forma semelhante ao uso do AAS. A inoculação das células da levedura proporcionou plantas infectadas com menos sintomas de podridão e com maior atividade para as enzimas relacionadas à resistência vegetal. Conclui-se, portanto, que a espécie de *T. globosa* (linhagem 6S01) tem grande potencial para ser empregada na agricultura como agente de proteção vegetal, contribuindo para a diminuição do emprego de fungicidas no campo e manutenção da produtividade das plantas em condições de estresse.

**Palavras-chave:** *Torulaspora globosa*. *Fusarium verticillioides*. Indução de Resistência Sistêmica.

## ABSTRACT

In maize, one of the most consumed vegetables in the world, numerous applications of agrochemicals are used to control phytopathogens that cause damage to human health and the environment. Among the main diseases affecting the crop, the fungus *Fusarium verticillioides* is responsible for causing root, stem and ear rot, in addition to causing damage to stored grains. Plants, naturally exposed to environmental stresses, have defense mechanisms that remain inactive or latent until triggered by adverse conditions. One of these mechanisms is known as Induced Systemic Resistance (ISR). Chemical agents such as acetylsalicylic acid (ASA) or biological agents such as plant growth promoting microorganisms (PGPM) can be used to trigger ISR. Although several works show the potentialities of ISR by PGPB, the study of the action of yeasts responsible for such mechanisms is still not completely elucidated. Considering the above, this study aimed to evaluate the capacity of the rhizospheric yeast *Torulaspora globosa* (strain 6S01) to trigger ISR in maize, in order to promote an immune response to the phytopathogen *F. verticillioides*. Therefore, maize plants were grown in pots, in a greenhouse, where they received the following treatments (at planting and from 4 days after emergence, every two days, for 11 days, totaling 7 applications): control (saline solution 0.85%), ASA solution (100mg/L), yeast cells ( $1 \times 10^5$  cells/ml) and yeast metabolites (filtered from the yeast growth medium for 48 hours). Treatments were applied with a spray bottle (5 ml/plant). After finishing the application of treatments, the plants were inoculated with 1ml of suspension of spores of the pathogen *F. verticillioides* ( $1 \times 10^6$  spores/ml). Ten days after fungus inoculation, the plants were analyzed for the degree of severity of symptoms of rot, plant development and activity of enzymes related to the plant defense system. The results show that, with the application of *T. globosa* yeast cells, systemic resistance was induced in maize plants, similarly to the use of ASA. The inoculation of yeast cells provided infected plants with less symptoms of rot and with greater activity for enzymes related to plant resistance. Therefore, it is concluded that the species of *T. globosa* (strain 6S01) has great potential to be used in agriculture as a plant protection agent, contributing to the decrease in the use of fungicides in the field and maintenance of plant productivity under conditions of stress.

**Keywords:** *Torulaspora globosa*. *Fusarium verticillioides*. Induction of Systemic Resistance.

## Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 OBJETIVOS.....	12
2.1 Objetivo geral .....	12
2.2 Objetivos específicos .....	12
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3.1 Material biológico.....	13
3.1.1 Levedura .....	13
3.1.2 Fungo fitopatogênico .....	13
3.1.3 Milho.....	13
3.2 Germinação das sementes de milho.....	13
3.3 Produção de inóculos .....	14
3.3.1 Inóculo de levedura.....	14
3.3.2 Inóculo do patógeno .....	14
3.4 Indução de resistência.....	14
3.5 Estresse vegetal biótico.....	16
3.6 Análises realizadas nas plantas de milho.....	16
3.6.1 Desenvolvimento vegetal.....	16
3.6.2 Descrição dos sintomas.....	16
3.6.3 Avaliação dos mecanismos de defesa.....	17
3.6.3.1 Extração vegetal.....	17
3.6.3.2 Proteínas totais.....	18
3.6.3.3 Atividade enzimática .....	18
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	20
4.1 Desenvolvimento vegetal.....	20
4.2 Sintomas causados pelo fitopatógeno nas plantas de milho .....	26
4.3 Enzimas de Defesa.....	29
4.3.1 Peroxidase.....	29
4.3.2 Polifenoloxidase .....	30
4.3.3 Fenilalanina amônia-liase .....	32
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES .....	35
6 REFERÊNCIAS .....	37

## 1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é um dos principais produtos do agronegócio brasileiro, sendo o segundo maior exportador mundial dessa cultura nos últimos anos (FAO, 2019). Segundo o último levantamento da CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento), no levantamento de março de 2021, a safra de 2020/2021 foi estimada em 108 mil toneladas de milho, com crescimento de 5,4% em comparação à safra de 2019/2020. Além de apresentar grande importância econômica, este é um dos cereais de maior relevância mundial na cadeia alimentar humana e animal, sendo fonte primordial de energia e carboidratos. O milho também pode ser utilizado como matéria-prima para combustíveis, bebidas, polímeros e diversos outros produtos (BORÉM; GIUDICE, 2004; MIRANDA, 2018). No entanto, apesar de o cultivo do milho estar presente em todas as regiões do país, anualmente a produção é afetada pela grande incidência de doenças que afetam a cultura (CASELA; FERREIRA; PINTO, 2006).

Dentre as doenças relacionadas ao milho, destacam-se as provocadas por fungos do gênero *Fusarium*. As espécies de *Fusarium* são capazes de causar doenças em sementes, morte de plântulas, podridão de colmo, podridão de raiz, podridão de espigas e danos em grãos armazenados (MUNKVOLD, 2003). No Brasil, a grande capacidade de os fungos causadores da podridão sobreviverem no solo se dá, principalmente, pelos plantios sucessivos e pela adoção do sistema de plantio direto sem rotação de culturas, permitindo o acúmulo de inóculos na área de cultivo (CONTINI *et al.*, 2019). Um dos patógenos que se destacam é o *Fusarium verticillioides*, espécie que está diretamente relacionada às perdas em produção e na baixa qualidade de grãos. Os fungos do gênero *Fusarium* produzem fumonisinas, grupo de micotoxinas termo estáveis reconhecidas por desencadarem câncer de esôfago e anormalidades no tubo neural em seres humanos (FIGUEIRA *et al.*, 2003).

As micotoxinas são metabólitos fúngicos secundários produzidos na fase de pré-colheita ou de armazenamento. A ocorrência de micotoxinas está associada à capacidade de biossíntese dos fungos que infectam os grãos e que, em decorrência dos processos envolvidos, desde a pré-colheita até o armazenamento, desenvolverem ambientes propícios para a propagação da contaminação (SILVA *et al.*, 2015). De acordo com a *Food and Agriculture Organization* (FAO), estima-se que 25% dos alimentos no mundo estejam contaminados com micotoxinas, o que coloca em risco a saúde humana e animal (LINO *et al.*, 2004). Como medida preventiva, as indústrias responsáveis pelo ramo alimentício, juntamente com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), impõem limites de tolerância para micotoxinas em produtos

derivados do milho (LANZA, 2013). Conseqüentemente, o extremo controle e a crescente contaminação pelas micotoxinas acarretam na perda da segurança alimentar e potenciais riscos toxicológicos graves para saúde humana e animal.

Dentro do cultivares, as plantas naturalmente são submetidas a inúmeros fatores de estresse ambiental, como os ataques por pragas e patógenos. No caso dos microrganismos, embora apresentem distintas estratégias e mecanismos de patogenicidade para invadir as células das plantas hospedeiras, o sucesso da infecção não é tão frequente devido a uma variedade de mecanismos adaptativos e de defesa desenvolvidos pelas plantas ao longo do processo evolutivo (SALOMON; SESSA, 2012). Mesmo que consigam superar as barreiras físicas dos tecidos vegetais, o que inclui a presença de ceras, cutículas e uma espessa camada de parede celular, os patógenos ainda estão sujeitos ao reconhecimento de suas moléculas pelo hospedeiro, que desencadeiam, a partir das vias de sinalização sistêmica, a ativação de distintas respostas de defesa por parte da planta. Esse mecanismo é denominado imunidade inata, o qual corresponde à primeira linha de defesa das plantas hospedeiras contra a invasão de patógenos e confere resistência à maioria dos micróbios invasores. Parte do sucesso se deve, principalmente, à rápida detecção desses invasores, além do largo espectro de especificidades de reconhecimento por parte de proteínas receptoras que estão presentes nas células das plantas hospedeiras (ZIPFEL, 2008).

Segundo Bonaldo et al. (2005), os mecanismos de defesa que permanecem inativos ou latentes até serem acionados diferem-se em Resistência Sistêmica Adquirida (RSA) e Resistência Sistêmica Induzida (RSI). O aparecimento de respostas locais causada por fitopatógenos, como necroses, podem induzir à resistência sistêmica adquirida e esta, por meio da geração de sinais móveis, produz secreções de proteínas PR, conferindo resistência de forma sistêmica a uma ampla gama de patógenos. Tal fenômeno é observado quando a mesma planta é atacada uma segunda vez (FU; DONG, 2013). Em contrapartida, a RSI, diferentemente da adquirida, não apresenta respostas locais e é desencadeada por agentes benéficos, simbiotes ou abióticos, sugerindo haver outra rota de sinalização ainda não completamente elucidada (KUC; TUZUN, 1992; BARROS *et al.*, 2010).

Entre os indutores abióticos capazes de ativar o sistema de defesa da planta, estão produtos comercialmente disponíveis, como o ácido acetilsalicílico (AAS), que atuam como elicitores de metabólitos secundários, importantes no aumento da resistência de mudas e plantas a ambientes potencialmente estressantes. De acordo com Campos *et al.* (2006), o AAS age como um mensageiro que ativa a resistência de plantas contra patógenos incluindo a síntese de proteínas que são enzimas que degradam polissacarídeos estruturais da parede celular de fungos

ou alteram a sua arquitetura, prejudicando o desenvolvimento do microrganismo e impedindo seu crescimento. O AAS atua também como sinalizador e mensageiro de moléculas que defendem as plantas contra estresses abióticos, como temperaturas elevadas e déficit hídrico (ORABI *et al.*, 2015) e toxicidades às plantas (METWALLY *et al.*, 2003). Os estímulos exógenos com AAS alteram as atividades antioxidantes de enzimas e aumentam a tolerância das plantas a estresses (DURRANT; DONG, 2004).

Dentre os agentes bióticos, os microrganismos presentes no solo apresentam-se envolvidos em diversos processos de interesse agrônomo, como fixação biológica de nitrogênio (VITOUSEK *et al.*, 2002), transformações de compostos fosfatados (BERTON *et al.*, 1997), alteração da disponibilidade e toxicidade de metais às plantas (BURD *et al.*, 2000), produção de fitormônios (GLICK, 1995), solubilização de minerais do solo, reguladores de nutrientes e controle biológico (SILVEIRA; FREITAS, 2007). Além disso, a comunidade microbiana pode auxiliar na tolerância à alta salinidade (ZHANG *et al.*, 2008) e à seca (CASTIGLIONI *et al.*, 2008) que interferem no desenvolvimento e na produtividade das plantas. Esse grupo de microrganismos é conhecido como promotores de crescimento vegetal (MPCV); podem ser encontrados na rizosfera, na superfície ou no interior dos tecidos das plantas e auxiliam o seu desenvolvimento por meio de diversos mecanismos, diretos e indiretos.

O principal mecanismo direto consiste na produção de hormônios vegetais, os quais podem proporcionar estímulo à germinação, maior desenvolvimento do sistema radicular e produção de biomassa vegetal. Dentre os hormônios produzidos por microrganismos, foram relatadas auxinas, giberelinas e citocininas (PÉREZ-MONTAÑO *et al.*, 2014). Mecanismos indiretos de promoção de crescimento vegetal consistem, principalmente, no controle de fitopatógenos ou estímulo do sistema de defesa da planta e na disponibilização de nutrientes, por meio da mineralização da matéria orgânica ou solubilização de minerais não lábeis no solo (DE OLIVEIRA *et al.*, 2003).

De acordo com Gomes *et al.* (2016), dentro do grupo MPCV, destacam-se as bactérias gram-negativas do gênero *Azospirillum*, *Gluconacetobacter*, *Pseudomonas* e *Rhizobium*; e gram-positivas do gênero *Bacillus* e *Paenibacillus*. Os autores ressaltam que características como motilidade, quimiotaxia, crescimento, aderência e resistência a estresses contribuem para a sobrevivência desses microrganismos na rizosfera. Além das bactérias, um grande número de leveduras está sendo estudada nos últimos anos, demonstrando que as leveduras rizosféricas podem contribuir para o crescimento de plantas. Dados publicados indicam que as leveduras rizosféricas que podem contribuir significativamente com o crescimento de plantas estão presentes nos gêneros *Cryptococcus* (CLOETE *et al.*, 2009), *Candida*, *Rhodotorula*,

*Sporobolomyces*, *Trichosporon* (EL-TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2006), *Williopsis* (NASSAR *et al.*, 2005) e *Yarrowia* (MEDINA *et al.*, 2004).

Bactérias e leveduras rizosféricas atuam de forma satisfatória como agentes bióticos na indução de resistência sistêmica. Em um estudo recente realizado por Syed-Ab-Rahman *et al.* (2019), notou-se que rizobactérias produtoras de compostos voláteis foram capazes de controlar fitopatógenos ao passo que promoviam o crescimento vegetal. Em leveduras, a espécie *Candida oleophila*, por exemplo, induziu resistência a *Penicillium digitatum* em toranjas (PORAT *et al.*, 2003), enquanto outros estudos utilizam apenas extratos da parede celular da levedura para promover a ação de resistência (NARUSAKA *et al.*, 2015). Dentre as leveduras rizosféricas, a *Torulaspora globosa* destaca-se por ser importante agente na promoção de crescimento vegetal (CABRINI; SALA; MAGRI, 2019; OLIVEIRA *et al.* 2019), controle biológico de fitopatógenos (ROSA *et al.*, 2010), produção de ácido indolacético (ALBERTINI, 2017) e solubilização de fosfato de cálcio *in vitro* (ROCHA, 2017).

Embora funções relacionadas à RSI tenham sido atribuídas às leveduras encontradas no ambiente, com sua baixa concentração no solo em relação a outros microrganismos, como bactérias e fungos filamentosos, há maior escassez de estudos direcionados ao conhecimento do seu potencial como agente indutor de resistência. Dessa forma, é de suma importância expandir o conhecimento sobre as relações das plantas de milho com a levedura rizosférica *T. globosa*, possibilitando futuras contribuições para minimizar a aplicação de agroquímicos e possibilitar o equilíbrio dos ecossistemas e a segurança alimentar.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Induzir resistência sistêmica em plantas de milho pela ação da levedura rizosférica *Torulaspora globosa* (6S01).

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar o desenvolvimento vegetal de plantas de milho com 19 dias após o cultivo, 30 dias após o cultivo em condições normais e 30 dias após o cultivo em condições de estresse biótico desencadeado pelo patógeno *F. verticillioides*.

- Avaliar a severidade dos sintomas em plantas de milho tratadas com o AAS, células de levedura e metabólitos e inoculadas com o patógeno *F. verticillioides*.

- Avaliar a ação da levedura rizosférica *T. globosa* (6S01) como indutora de resistência sistêmica em plantas de milho sob condições de estresse biótico e não estresse, por meio da análise de alterações enzimáticas relacionadas à resistência no tecido vegetal.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Material biológico**

##### **3.1.1 Levedura**

Foi utilizada a linhagem de levedura *T. globosa* (linhagem 6S01), isolada da rizosfera de milho, pertencente ao banco de microrganismos do Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM), da Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Agrárias, *campus* Araras/SP. A levedura foi selecionada por apresentar potencial para promoção de crescimento vegetal (CABRINI; SALA; MAGRI, 2019) e para controle biológico de fitopatógenos (ROSA *et al.*, 2010). Essa linhagem vem sendo mantida em tubos de ensaio com meio inclinado YEPD (10g/L extrato de levedura, 20g/L peptona, 20g/L dextrose e 15g/L ágar), cobertas com óleo mineral, em geladeira a 8°C.

##### **3.1.2 Fungo fitopatogênico**

O fungo fitopatogênico escolhido para proporcionar o estresse biótico ao milho foi o *F. verticillioides*, causador da podridão de raiz, no sistema vascular das plantas de milho e na espiga. A cepa utilizada foi disponibilizada pelo Laboratório de Cultura de Tecidos e Fisiologia Vegetal, da Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Agrárias, *campus* Araras, sob responsabilidade do Prof. Dr. Jean Carlos Cardoso.

##### **3.1.3 Milho**

As sementes de milho utilizadas pertencem a variedade IAC AIRAN – Lote IA 92/2018 cedidas pelo Instituto Agrônomo de Campinas e escolhidas para este trabalho por apresentarem alta taxa de germinação nas condições experimentais propostas.

#### **3.2 Germinação das sementes de milho**

Para os experimentos, as sementes foram desinfetadas por imersão em álcool 70% por 3 minutos, seguida por imersão em solução de hipoclorito de sódio 2% por 5 minutos e após

esse tempo, lavadas abundantemente com água destilada estéril para a remoção do excesso de cloro e secadas ao ar, dentro da câmara de fluxo laminar. Após a assepsia, as sementes selecionadas foram colocadas em placa de Petri contendo papel filtro umedecido com 2ml de água destilada estéril. As placas, com quatro sementes cada, foram mantidas em BOD a 30°C. Após quatro dias de incubação, as sementes saudáveis de mesmo tamanho de radícula foram transferidas para vasos plásticos de 6L contendo solo adubado com 8g/vaso de adubo NPK 4-14-8. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação para possibilitar o pleno desenvolvimento das plantas.

### **3.3 Produção de inóculos**

#### **3.3.1 Inóculo de levedura**

Para o preparo do inóculo, a levedura *T. globosa* (6S01) foi reativada em placas de Petri com meio YEPD sólido e incubadas a 25°C até o desenvolvimento das colônias. Uma alçada de células das colônias crescidas foi transferida para tubos falcon com 10ml de meio YEPD líquido, sob agitação de 160rpm, a 25°C por 48 horas. Após esse tempo, os tubos foram centrifugados a 3000rpm por 5 minutos; o sobrenadante foi separado e as células ressuspensas em solução salina 0,85% estéril. A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer e padronizadas para  $1 \times 10^5$  de células/ml. O sobrenadante, posteriormente, foi filtrado em membrana de 0,22 $\mu$ m e utilizado nos tratamentos como metabólitos da levedura.

#### **3.3.2 Inóculo do patógeno**

Para o preparo do inóculo, o fungo fitopatogênico *F. verticillioides* foi cultivado em placa de Petri contendo meio BDA (Batata Dextrose Agar) e armazenado em BOD a 30°C por sete dias. Após a incubação, foi adicionado 5ml de solução salina 0,85% estéril em temperatura ambiente em cada placa e com a alça de platina por meio de movimentos circulares foram soltos os esporos em suspensão. A contagem dos esporos foi realizada em câmara de Neubauer e padronizadas para  $1 \times 10^6$  de esporos/ml.

### **3.4 Indução de resistência**

Como controle positivo para indução de resistência do milho, foi utilizado o AAS na concentração de 100mg/L. O reagente foi diluído inicialmente em 2ml de dimetilsulfóxido, composto que não apresenta alterações e toxicidades à planta, e água destilada estéril até atingir o volume final. A indução de resistência promovida pela levedura *T. globosa* após a germinação

das sementes foi realizada de duas formas: uso das células da levedura e uso do filtrado contendo os metabólitos. O tratamento a partir das células da levedura continha o inóculo ressuspenso em solução salina 0,85% estéril. O tratamento com o filtrado contendo os metabólitos foi obtido do sobrenadante filtrado do inóculo de células da levedura (a produção do inóculo e a obtenção do filtrado foram descritos no item 3.3.1). O AAS, as células da levedura, o filtrado dos metabólitos e o controle (solução salina 0,85%), foram aplicados por duas vias diferentes: incorporados ao substrato de germinação e pulverizados na parte aérea da planta, ambas utilizando borrifadores.

A primeira aplicação aconteceu no dia que as sementes foram transplantadas para os vasos. As outras aplicações foram realizadas de dois em dois dias, desde o 4º dia até o 15º dia após o plantio, totalizando sete aplicações dos tratamentos. Foram utilizados 8 vasos por tratamento, distribuídos por delineamento inteiramente casualizado (Figura 1).



**Figura 1.** A - Transplante das sementes pré-germinadas em placas para os vasos em casa de vegetação e primeira aplicação do tratamento. B - Vasos distribuídos por delineamento inteiramente casualizado.

Após 19 dias do plantio das plantas, foi realizada a primeira coleta de 8 vasos por tratamento, para análise do crescimento vegetal e indução de resistência. Dos vasos restantes, um grupo recebeu a inoculação do fungo fitopatígeno (com estresse) e outro grupo não recebeu a inoculação (sem estresse), de acordo com os tratamentos (Quadro 1). As plantas permaneceram na casa-de-vegetação até 30 dias após o plantio, quando foram coletadas e analisadas.

**Quadro 1.** Descrição dos tratamentos para indução de resistência e análise após aplicações.

Vasos	Tratamento	Condições	Siglas
1 a 8	Controle	Controle de Indução de Resistência*	C/CI
9 a 16	AAS	Controle de Indução de Resistência*	AAS/CI
17 a 24	Levedura	Controle de Indução de Resistência*	L/CI
25 a 32	Metabólito	Controle de Indução de Resistência*	M/CI
33 a 40	Controle	Sem Estresse**	C/SE
41 a 48	AAS	Sem Estresse**	AAS/SE
49 a 56	Levedura	Sem Estresse**	L/SE
57 a 64	Metabólito	Sem Estresse**	M/SE
73 a 80	Controle	Estresse com Patógeno**	C/EP
81 a 88	AAS	Estresse com Patógeno**	AAS/EP
89 a 96	Levedura	Estresse com Patógeno**	L/EP
97 a 104	Metabólito	Estresse com Patógeno**	M/EP

\*Plantas coletadas para análise 19 dias após o plantio.

\*\* Plantas coletadas para análise 30 dias após o plantio.

### 3.5 Estresse vegetal biótico

Foi realizada a infecção das plantas pelo fitopatógeno *F. verticillioides* 20 dias após o início do cultivo, sendo cinco dias após a última aplicação dos tratamentos indutores de resistência. A inoculação foi feita por meio de ferimentos superficiais abertos na base do caule da planta. Foram inoculados com seringa 1ml de  $1 \times 10^6$  de esporos/ml.

### 3.6 Análises realizadas nas plantas de milho

#### 3.6.1 Desenvolvimento vegetal

A análise do desenvolvimento da planta foi realizada com 19 dias de cultivo e com 30 dias de cultivo (metade das plantas infectadas com o fungo fitopatógeno). As análises de desenvolvimento consistiram em medidas de comprimento de raiz, comprimento parte aérea e massa seca de raiz. Para isso, a planta foi separada (parte aérea e raiz) e realizada a medida com fita métrica. Em seguida a parte aérea foi embrulhada em papel alumínio para análise enzimática. A raiz foi armazenada em sacos de papel e incubados a 60°C até atingir peso constante para medida da massa seca.

#### 3.6.2 Descrição dos sintomas

A análise dos sintomas demonstrados em cada tratamento, após 10 dias de infecção pelo patógeno *F. verticillioides*, foi realizada conforme Bosqueiro (2019) com adaptações para as

descrições das categorias (Quadro 2).

**Quadro 2.** Categorias para a descrição dos sintomas desenvolvidos após 10 dias de infecção.

<b>Estrutura</b>	<b>Categorias</b>	<b>Descrição</b>
Colmos	0	Sintomas não visíveis
	1	$\leq 30\%$ acometido
	2	$> 30\%$ e $\leq 60\%$ acometido
	3	$> 60\%$ e $\leq 100\%$ acometido
Folhas	0	Sintomas não visíveis
	1	$\leq 30\%$ acometidas
	2	$> 30\%$ e $\leq 60\%$ acometidas
	3	$> 60\%$ e $\leq 100\%$ acometidas

### 3.6.3 Avaliação dos mecanismos de defesa

#### 3.6.3.1 Extração vegetal

Os mecanismos de defesa das plantas contra estresses ambientais envolvem alterações metabólicas relacionadas com atividades enzimáticas nos metabolismos primário e secundário. Dentre esses mecanismos, o grupo de peroxidases, polifenoloxidasas e fenilalanina amônia-liases representam um papel importante na defesa da planta (DE ARAUJO; MENEZES, 2009). Para a determinação da atividade de peroxidases (POD), polifenoloxidasas (PPO) e fenilalanina amônia-liases (FAL), o material foliar foi coletado com 19 dias de cultivo (plantas sem estresse) e com 30 dias de cultivo (plantas com estresse e não estresse). As amostras de tecidos foliares coletadas foram embrulhadas em papel alumínio, congeladas e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até serem processadas para as diferentes análises bioquímicas. O protocolo de extração seguido foi descrito por Silva *et al.* (2007). Inicialmente, tecidos foliares congelados foram macerados com 10ml de tampão acetato de sódio 0.1M pH 5,0 gelado para extração e submetidos à centrifugação refrigerada a  $4^{\circ}\text{C}$ , 15.000g, durante 20 minutos. O sobrenadante foi separado e considerado como extrato proteico para análise enzimática e para a quantificação do teor de proteínas totais por meio do método de Bradford. As leituras da atividade enzimática e avaliação de teor de proteínas totais foram realizadas na leitora de microplacas Tecan Infinite M200 utilizando microplacas de 96 poços estéreis (Costar), em volume final de trabalho de 200 $\mu\text{l}$ . Desta forma, os volumes dos reagentes foram reduzidos proporcionalmente para uso das microplacas.

### 3.6.3.2 Proteínas totais

O teor de proteínas totais foi determinado pelo método de Bradford (1976), sendo que para cada amostra se utilizou 2µL de extrato proteico, 158µL de água Milli-Q estéril e 40µL de reagente Bradford (composto pó 250 mg de corante Comassie Brilliant Blue G-250, 125mL de ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) e 125mL de água destilada). O reagente de Bradford foi adicionado às amostras que foram incubadas por 5 minutos, efetuando-se a leitura de absorvância a 595nm. Cada amostra foi composta em duplicata. Na prova em branco, utilizada para calibração do aparelho de leitura, se utilizou 2µL de tampão acetato de sódio 0.1M pH 5,0, 158µL de água Milli-Q estéril e 40µL de reagente Bradford. A absorvância foi plotada em curva padrão para proteínas ( $y = 0,1667x + 0,0091$ , onde “y” é a absorvância a 59nm e “x” a concentração de proteína (mg)) (Figura 2).

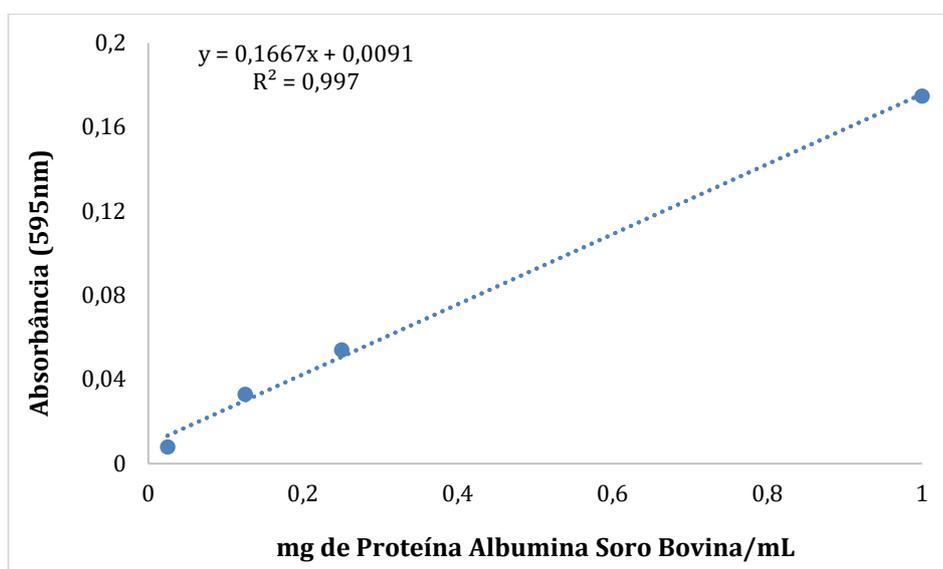


Figura 2. Curva padrão para proteínas.

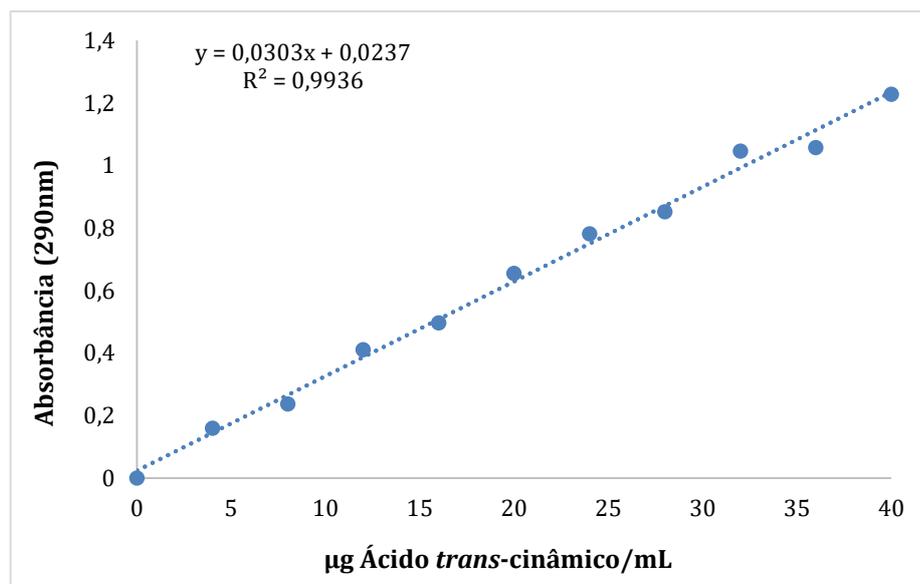
### 3.6.3.3 Atividade enzimática

Peroxidases são responsáveis por catalisar a oxidação de compostos orgânicos que possuem importante ação na resistência química e mecânica em condições de estresse (CAMPOS; SILVEIRA, 2003). A atividade de peroxidase foi determinada por método espectrofotométrico, por meio da conversão do guaiacol em tetraguaiacol (LUSSO; PASCHOLATI, 1999). A reação consistiu em 7µl do extrato proteico enzimático e 193µl de solução contendo 250µl de guaiacol e 360µl de peróxido de hidrogênio em 100mL de tampão fosfato de sódio 0.01M pH 6,0. A reação foi realizada a 25°C por 10 minutos, em que houve leituras da unidade de absorvância (470nm) no minuto 0 e no minuto 10. A unidade de atividade

de POD foi definida pela mudança de absorvância de 0,01 por minuto a 470nm por mg de proteína total (U/min/mg prot).

Polifenoloxidasas são enzimas que atuam na oxidação de compostos fenólicos que geram ação antimicrobiana (CAMPOS; SILVEIRA, 2003). A análise de polifenoloxidasas se deu pela mensuração da conversão do catecol em quinona (DUANGMAL; APENTEN, 1999). A reação consistiu em 20 $\mu$ l do extrato proteico enzimático e 180 $\mu$ l de catecol 0.02M dissolvido em tampão fosfato de sódio 0.1M pH 6,8. A reação foi realizada a 30°C por 1 minuto, em que houve leituras da unidade de absorvância (420nm) a cada 10 segundos. O diferencial entre a terceira e a quinta leitura foi utilizado para a determinação da atividade. A unidade de atividade de PPO foi definida pelo incremento de absorvância de 0,001 por minuto a 420nm por mg de proteína total (U/min/mg prot).

A enzima fenilalanina amônia-liase atua como catalisadora da L-fenilalanina em ácido *trans*-cinâmico e amônia e possui importante ação na resposta de defesa gerada em infecções (PASCHOLATI *et al.*, 1986). Sua atividade foi determinada pela quantificação colorimétrica do ácido *trans*-cinâmico liberado do substrato fenilalanina (UMESHA, 2006). A reação consistiu em 20 $\mu$ l de extrato protéico enzimático, 80 $\mu$ l de solução tampão Tris-HCl 0.025M pH 8,8, 100 $\mu$ l de L-fenilalanina 0.05M dissolvida em tampão Tris-HCl 0.025M pH 8,8. A reação foi incubada a 40°C por 2 horas e, após a esse período, foi acrescentado 20 $\mu$ l de solução HCl 6N para interromper a reação. A absorvância das amostras foi determinada a 290nm, sendo subtraído de cada amostra o valor do controle (20 $\mu$ l de extrato proteico enzimático, 180 $\mu$ l de solução tampão Tris-HCl 0.025M pH 8,8) A atividade enzimática foi expressa em  $\mu$ g de ácido *trans*-cinâmico (ácido *trans*-cinâmico/min/mg de prot). A absorvância das amostras foi calculada de acordo com a curva padrão para o ácido *trans*-cinâmico ( $y = 0,0303x + 0,0237$ , onde “y” é a absorvância a 290nm e “x” a concentração de ácido *trans*-cinâmico) utilizando uma curva padrão para o ácido (Figura 3).



**Figura 3.** Curva padrão para ácido *trans*-cinâmico.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Desenvolvimento vegetal

As primeiras análises realizadas em nosso experimento ocorreram 19 dias após o plantio (Figura 4) e buscaram mensurar o desenvolvimento da parte aérea, comprimento e massa seca de raiz para avaliar a capacidade dos tratamentos em promover o desenvolvimento do milho.



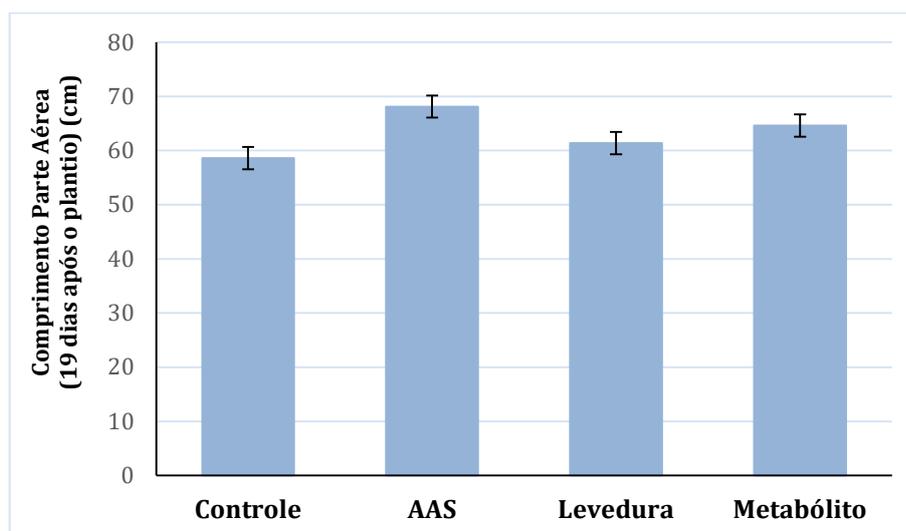
**Figura 4.** Experimento em casa de vegetação com 19 dias após o plantio.

Os resultados observados para o desenvolvimento vegetal (Figuras 5, 6 e 7) mostram que os tratamentos não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 1). Para a variável comprimento da parte aérea, o valor médio para o tratamento com AAS foi superior aos demais (Figura 5). De acordo com Khan *et al.* (2003) há aumento da captação de CO<sub>2</sub> e, conseqüentemente, aumento da taxa fotossintética após 48h de aplicação de AAS em plantas de milho e soja. Tal processo pode ser o responsável pelo melhor desenvolvimento das plantas.

**Tabela 1.** Análise estatística dos dados de desenvolvimento das plantas de milho coletadas 19 dias após o plantio.

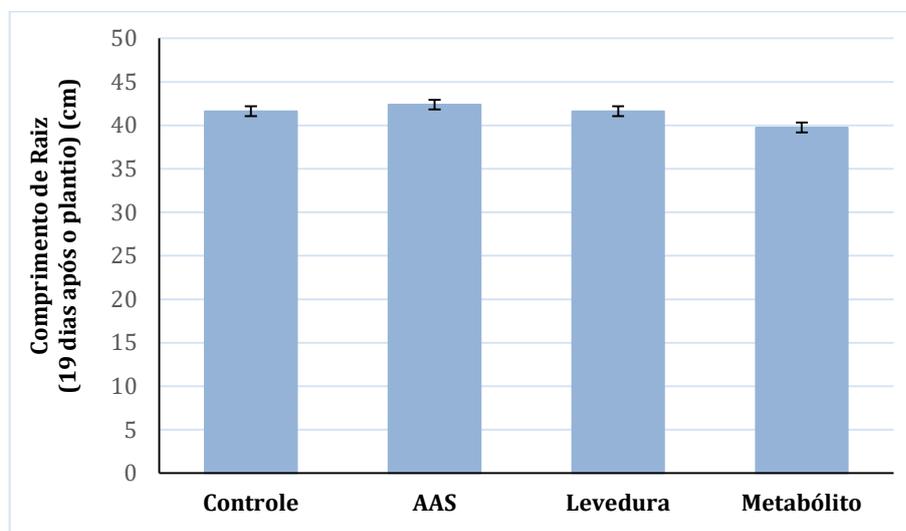
Análise de Variância	Comprimento Parte aérea	Comprimento Raiz	Massa Seca Raiz
GL resíduo	28	28	28
F tratamentos	0,49	0,10	1,17
Média geral	63,19	41,34	1,72
Desvio-padrão	16,65	10,21	1,16
DMS (5%)	22,73	13,94	1,59
CV (%)	26,35	24,70	67,68
Teste de Tukey a 5%:			
Controle	58,63 a	41,63 a	1,18 a
AAS	68,13 a	42,38 a	1,78 a
Levedura	61,38 a	41,63 a	1,66 a
Metabólito	64,63 a	39,75 a	2,26 a

GL: graus de liberdade; DMS: diferença mínima significativa; CV: coeficiente de variação.



**Figura 5.** Comprimento parte aérea de plantas de milho 19 dias após o plantio.

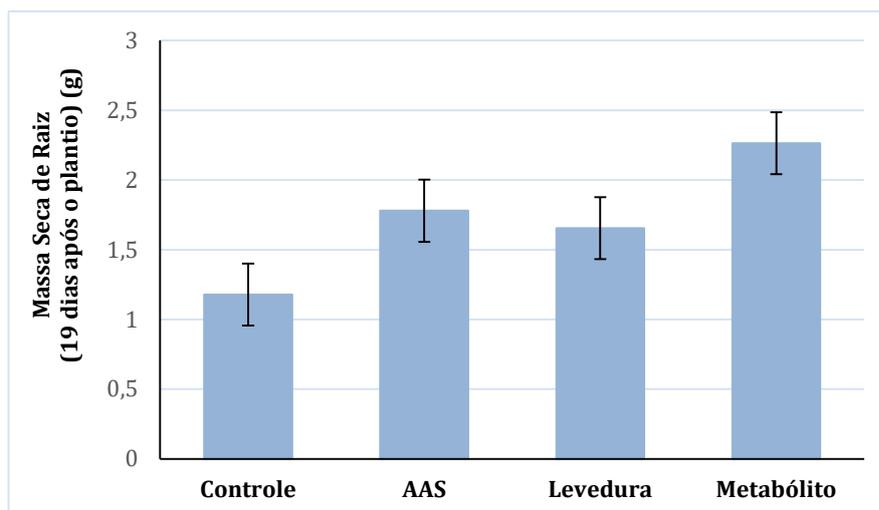
Para os dados de comprimento de raiz (Figura 6), podemos observar, pelos valores médios dos tratamentos, que não houve influência desses no desenvolvimento radicular.



**Figura 6.** Comprimento de raiz de plantas de milho 19 dias após o plantio.

Cabrini, Sala e Magri (2019) observaram que a inoculação da levedura *T. globosa* em mudas de alface proporcionou aumento de massa seca de raiz, porém, com redução do comprimento da raiz. Esse dado refere-se ao fato de que esta linhagem de levedura produz grande quantidade de ácido indol acético (AIA), observado em condições de laboratório. Sendo o AIA uma auxina, esta promove aumento do desenvolvimento de pêlos e ramificações na raiz, enquanto reduz seu comprimento (IDRIS *et al.* 2007). Nossos resultados, no entanto, mostram que, apesar da presença da levedura, esta não comprometeu o comprimento da raiz se comparado aos outros tratamentos estudados.

Para a variável massa seca de raiz (Figura 7), foi observado valor médio superior no tratamento com metabólitos em relação aos outros tratamentos, contudo, não foi observada diferença estatística significativa entre eles. É importante ressaltar que o tratamento com metabólitos foi obtido do meio de cultura em que as células de levedura se desenvolveram. Apesar da filtração, compostos nutricionais próprios do meio de cultura permaneceram no tratamento, o que poderia ter contribuído para o aumento da massa seca de raiz.



**Figura 7.** Massa seca de raiz de plantas de milho 19 após o plantio.

A análise do desenvolvimento das plantas 30 dias após o plantio mostrou que aquelas submetidas ao estresse pelo fitopatógeno, para os tratamentos com controle e metabólito, apresentaram menor comprimento da parte aérea e comprimento de raiz. Para a variável massa seca de raiz não foi observado diferença estatística entre os tratamentos (Tabela 2).

**Tabela 2.** Análise estatística dos dados de desenvolvimento das plantas de milho coletadas 30 dias após o plantio.

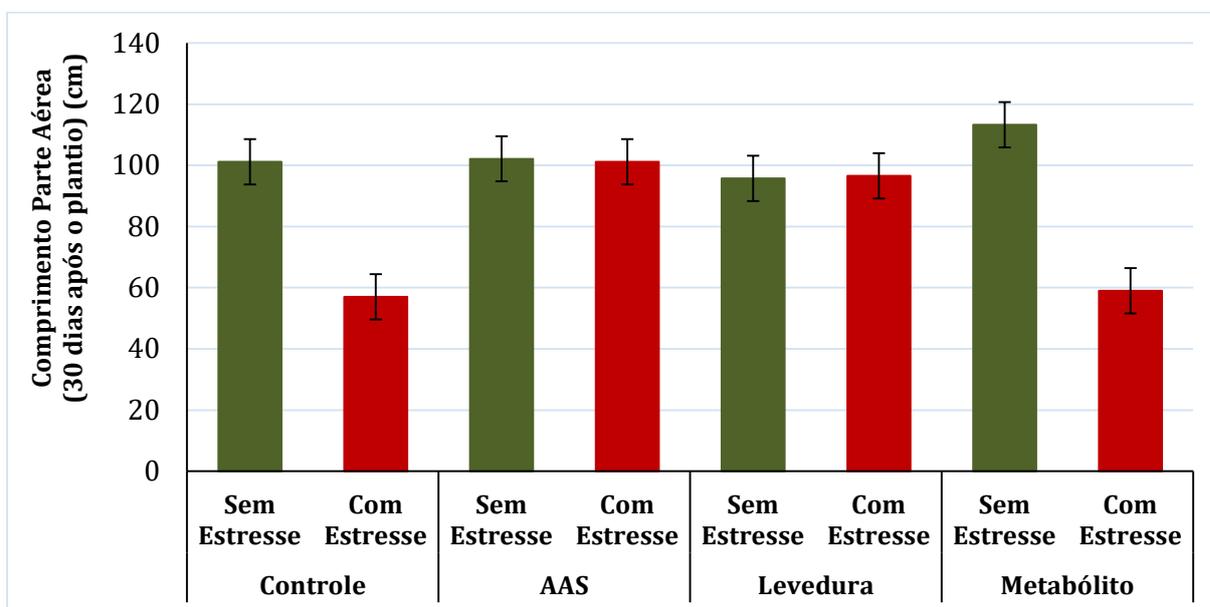
Análise de Variância	Comprimento Parte Aérea	Comprimento Raiz	Massa Seca Raiz
GL resíduo	48	48	48
F tratamentos	12,85 **	4,58 **	1,59
Média geral	90,75	71,23	7,89
Desvio-padrão	15,43	12,07	4,44
DMS (5%)	26,13	20,45	7,52
CV (%)	17,00	16,95	56,28
Teste de Tukey a 5%:			
Controle com Estresse	57,00 b	65,43 ab	3,96 a
AAS com Estresse	101,14 a	76,29 a	10,53 a
Levedura com Estresse	96,57 a	75,86 a	7,56 a
Metabólito com Estresse	59,00 b	49,29 b	6,88 a
Controle sem Estresse	101,14 a	73,00 a	10,03 a
AAS sem Estresse	102,14 a	79,00 a	8,29 a
Levedura sem Estresse	95,71 a	77,14 a	6,69 a
Metabólito sem Estresse	113,29 a	73,86 a	9,17 a

Nível de significância: \*\*: 1%; \*: 5%.

GL: grau de liberdade; DMS: diferença mínima significativa; CV: coeficiente de variação.

As plantas que não foram infectadas com o fungo fitopatogênico, independente do tratamento que receberam, não diferiram entre si para as variáveis de desenvolvimento vegetal avaliadas (Figuras 8, 9 e 10). Ao observar os gráficos, é possível observar que o emprego dos tratamentos com AAS e células de levedura não se diferenciaram quando comparados em condições de estresse e não estresse. Portanto, é possível observar que os tratamentos proporcionaram a ativação do sistema de defesa das plantas, possibilitando a manutenção do seu desenvolvimento mesmo na presença do fungo fitopatogênico.

Os indutores de resistência vegetal abióticos, capazes de ativar o sistema de defesa da planta, como o AAS, atuam como elicitores de metabólitos secundários importantes no aumento da resistência de mudas e plantas a ambientes potencialmente estressantes. De acordo com Campos *et al.* (2006), a função mais bem compreendida do AAS em plantas é como mediador de respostas de defesa, tanto local quanto sistemicamente. O interessante em nossos resultados foi observar que a levedura desenvolveu papel semelhante ao realizado pelo AAS. Com base no potencial das leveduras rizosféricas promotoras de crescimento vegetal como agentes de indução de resistência sistêmica, este é o primeiro trabalho que busca identificar a ação da levedura *T. globosa* como indutora de resistência vegetal concomitantemente a sua ação comprovada de promoção de crescimento vegetal.



**Figura 8.** Comprimento parte aérea de plantas de milho 30 dias após o plantio.

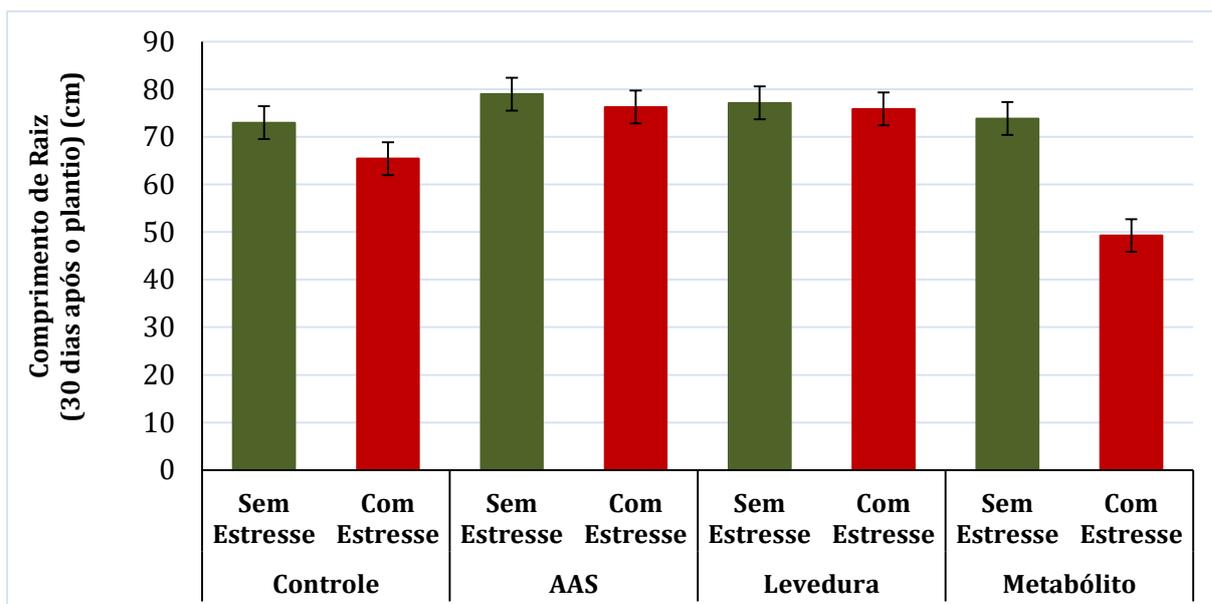


Figura 9. Comprimento de raiz de plantas de milho 30 dias após o plantio.

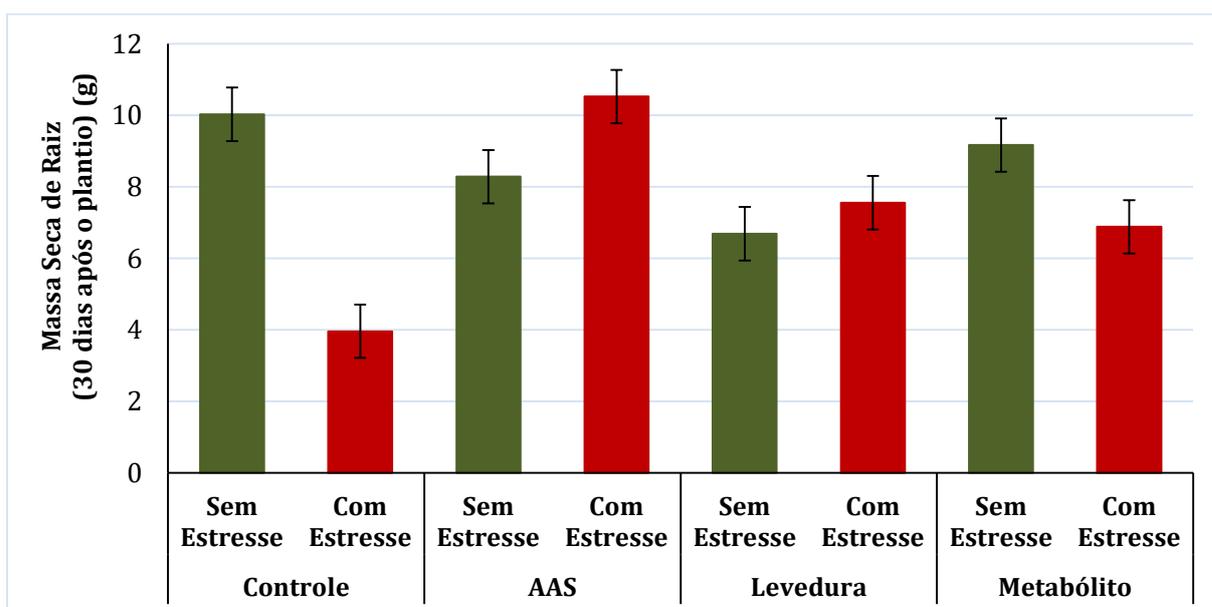


Figura 10. Massa seca de raiz de plantas de milho 30 dias após o plantio.

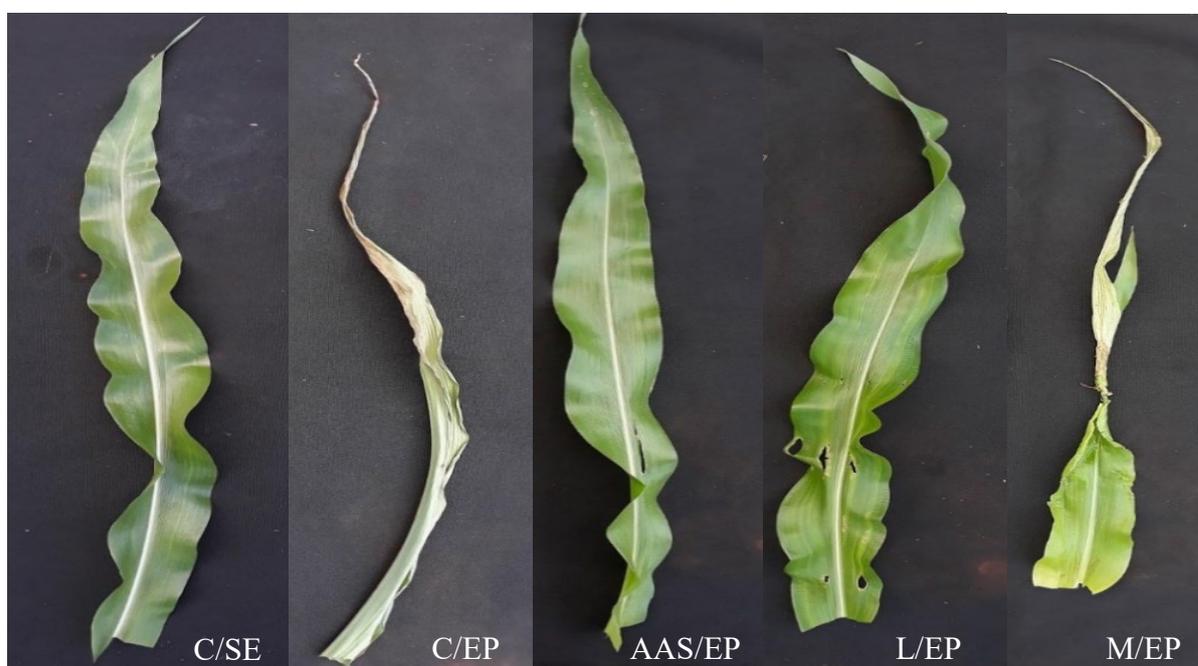
A princípio, a RSI requer microrganismos benéficos que, eficientemente, colonizem o sistema radicular das plantas hospedeiras para que haja o estabelecimento de uma associação mutualista de sucesso. Sendo assim, acredita-se que microrganismos promotores de crescimento vegetal estabeleçam um diálogo molecular capaz de induzir a resistência sistêmica (PIETERSE *et al.*, 2014; BURKETOVA *et al.*, 2015). Segundo Syed-Ab-Rahman *et al.* (2019), rizobactérias produtoras de compostos voláteis foram capazes de controlar fitopatógenos ao passo que promoviam o crescimento vegetal. O mecanismo utilizado pelas leveduras para

promover o desenvolvimento das plantas difere de acordo com a espécie. A produção de fitormônios reguladores de crescimento tem sido descrita como a principal (EL-TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2006) e, dentre os compostos produzidos pelas leveduras, estão as auxinas (AIA) e as giberelinas (CLOETE *et al.*, 2009).

#### 4.2 Sintomas causados pelo fitopatógeno nas plantas de milho

Após as análises de desenvolvimento vegetal, foi possível observar o impacto do fungo fitopatogênico por meio da análise dos sintomas nas plantas (Figuras 11, 12 e 13).

Durante a análise qualitativa, criamos uma escala de sintomas (Quadro 2) para melhor descreve-los. Os resultados estão apresentados na Figura 14.



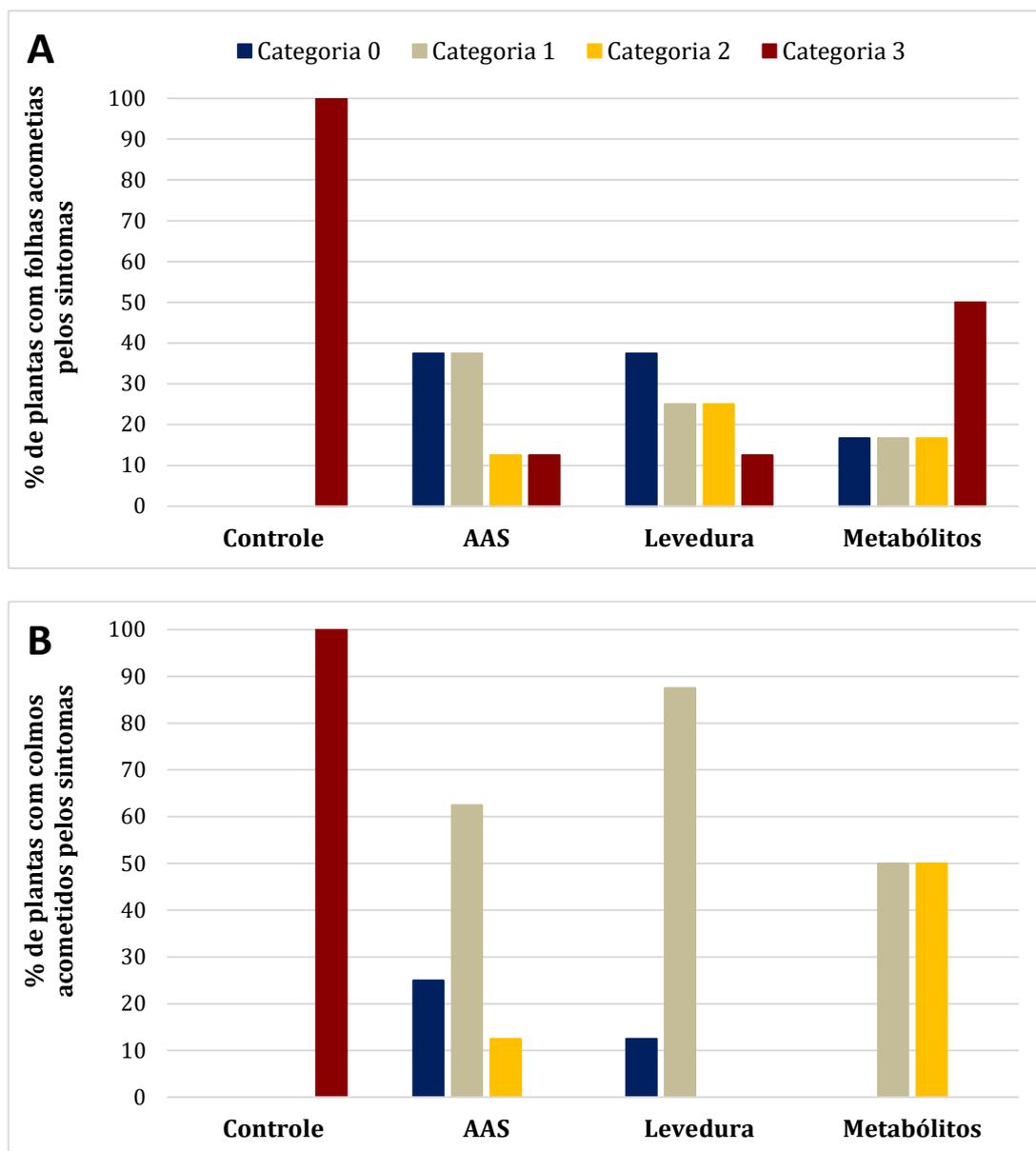
**Figura 11.** Folhas de milho 30 dias após o plantio. C/SE – Controle e sem estresse. C/EP – Controle e estresse com patógeno. AAS/EP – Planta que recebeu tratamento AAS e estresse com patógeno. L/EP – Planta que recebeu tratamento com células de levedura e estresse com patógeno. M/EP – Planta que recebeu tratamentos com metabólitos e estresse com patógeno. Não há escala definida entre as fotografias.



**Figura 12.** Colmos de milho 30 dias após o plantio. C/SE – Controle e sem estresse. C/EP – Controle e estresse com patógeno. AAS/EP – Planta que recebeu tratamento AAS e estresse com patógeno. L/EP – Planta que recebeu tratamento com células de levedura e estresse com patógeno. M/EP – Planta que recebeu tratamentos com metabólitos e estresse com patógeno. Não há escala definida entre as fotografias.



**Figura 13.** Corte transversal em colmos de milho 30 dias após o plantio. C/SE – Controle e sem estresse. C/EP – Controle e estresse com patógeno. AAS/EP – Planta que recebeu tratamento AAS e estresse com patógeno. L/EP – Planta que recebeu tratamento com células de levedura e estresse com patógeno. M/EP – Planta que recebeu tratamentos com metabólitos e estresse com patógeno. Não há escala definida entre as fotografias.



**Figura 14.** Sintomas apresentados nas folhas (A) e colmos (B) após 10 dias de infecção pelo patógeno. Categoria 0 (azul) representa sintomas não visíveis; categoria 1 (cinza) representa  $\leq 30\%$  acometido; categoria 2 (amarelo) representa  $> 30\%$  e  $\leq 60\%$  acometido; categoria 3 (vermelho) representa  $> 60\%$  e  $\leq 100\%$  acometido.

O tratamento controle apresentou somente a categoria 3, tanto para colmo como para as folhas, demonstrando alta severidade dos sintomas nas plantas. O tratamento com metabólitos demonstrou categorias 1 e 2 em sintomas nos colmos e categorias 0, 1, 2 e 3 nas folhas, sugerindo que houve certa resistência das plantas à infecção. Os tratamentos com AAS e células de leveduras foram os que melhor demonstraram resistência nos sintomas, não apresentando nenhum sintoma de categoria 3 nos colmos. Nas folhas, o tratamento com células de levedura apresentou aproximados 10% de sintomas de categoria 3, o mesmo que observado para o tratamento com AAS. Contudo, é possível observar aproximados 40% de categoria 0 em

tratamentos com células de levedura e AAS, dado que representa a proteção da planta contra o fitopatógeno. Apesar de apresentar sintomas de categoria 2 e 3, o tratamento com células de levedura demonstra que inicialmente a planta desenvolveu a infecção provocada pelo patógeno em seu sistema, mas conseguiu resistir aos ataques de podridão nos colmos, contribuindo para a manutenção da nutrição vegetal, possibilitando a continuidade de seu desenvolvimento.

### 4.3 Enzimas de Defesa

#### 4.3.1 Peroxidase

A avaliação da produção da enzima peroxidase pelas plantas (Figura 15) mostrou que esta se manteve baixa nas plantas até 19 dias após o plantio. A análise realizada 30 dias após o plantio, porém, mostrou que houve aumento no valor médio da enzima nas plantas tratadas com AAS e células de levedura em condições de não estresse. Para as plantas que receberam o estresse causado pelo fitopatógeno, o aumento da atividade de peroxidase ficou evidenciado nas plantas controle e nas tratadas com células de levedura.

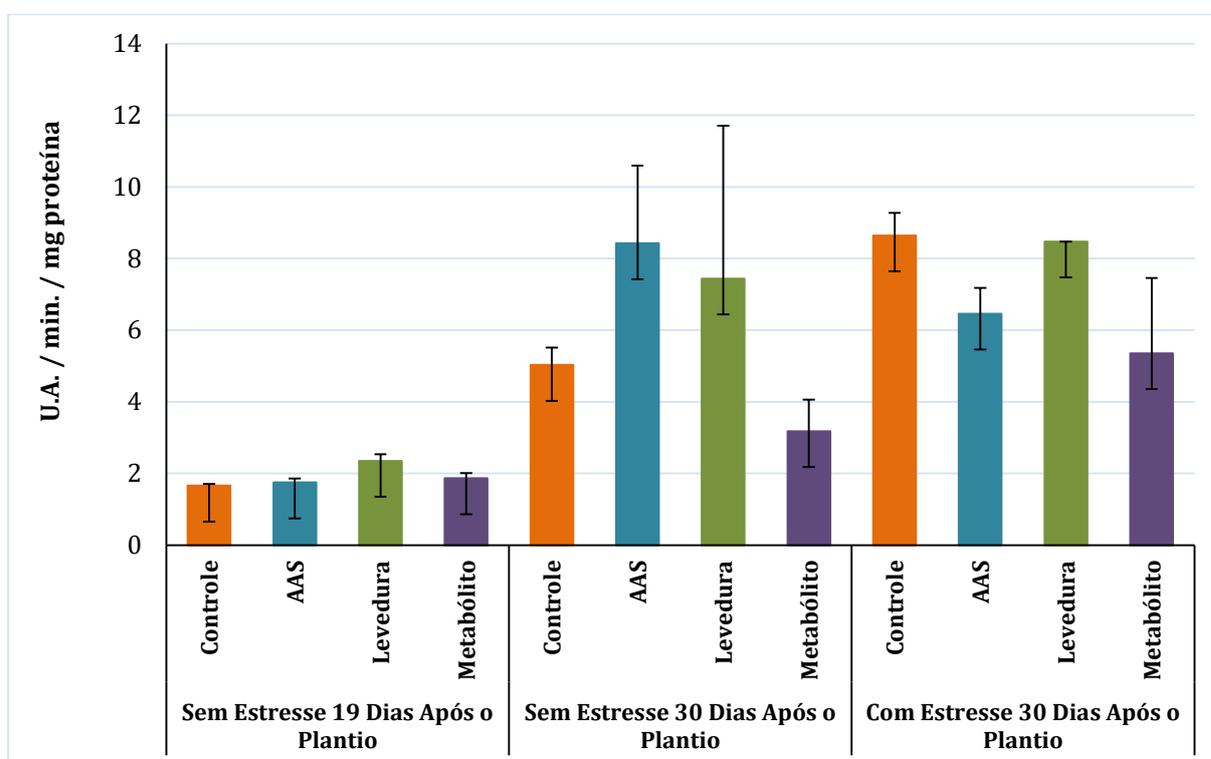


Figura 15. Variação da peroxidase nos extratos vegetais de plantas de milho.

A alta atividade da enzima nas plantas controle (com 30 dias após o plantio) que receberam o estresse do patógeno, demonstra o trabalho ativo do sistema de defesa da planta à presença do fungo filamentosos. Esta atividade, porém, não se mostrou suficiente para resistir a infecção, conforme observado pelas análises dos sintomas (Figura 14). Em contrapartida, a alta na atividade de peroxidase nas plantas que receberam o tratamento com células de levedura (com e sem estresse), demonstra que o tratamento proporcionou forte indução do sistema de defesa das plantas, com redução nos sintomas de podridão, tanto nos colmos, quanto nas folhas. (Tabela 3).

**Tabela 3.** Atividade de peroxidase nos extratos de plantas de milho.

Tratamento	Dias Após o Plantio	Estresse	Peroxidase
Controle	19	Não	1,66 d
	30	Não	5,03 abcd
	30	Sim	8,64 a
AAS	19	Não	1,75 d
	30	Não	8,42 a
	30	Sim	6,46 abc
Levedura	19	Não	2,35 cd
	30	Não	7,44 ab
	30	Sim	8,47 a
Metabólito	19	Não	1,87 cd
	30	Não	3,18 bcd
	30	Sim	5,35 abcd
CV (%)			30,94

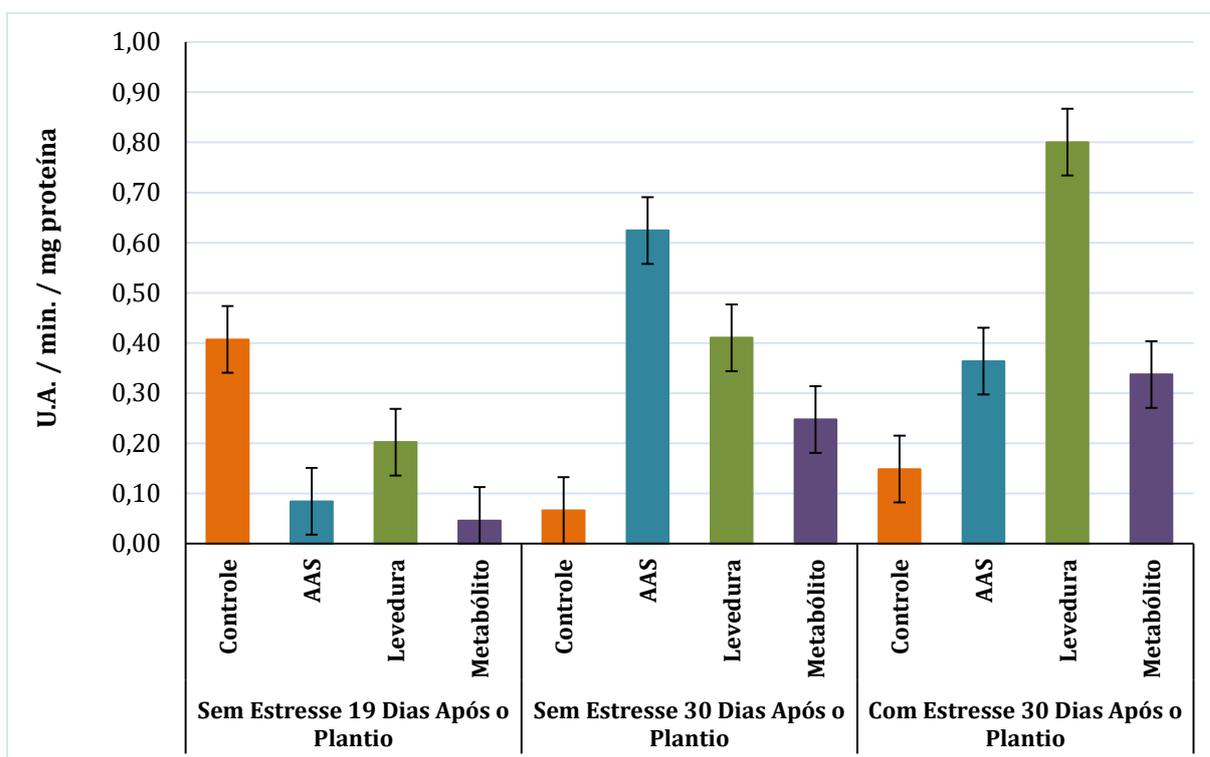
Teste de Tukey. As médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si. CV% = coeficiente de variação em %.

De acordo com Campos e Silveira (2003), as peroxidase se localizam na parede celular e são responsáveis por catalisar a oxidação do substrato a partir de  $H_2O_2$  ou de peróxidos orgânicos e possuem importante atuação na modificação estrutural, aumentando a resistência química e mecânica em condições de estresse. Além disso, a atividade de peroxidase reflete no reconhecimento das células ou metabólitos da levedura por parte das plantas, o que acarreta em alterações no metabolismo e podendo gerar indução de resistência (RONCATTO; PASCHOLATI, 1998).

#### 4.3.2 Polifenoloxidase

A atividade da enzima polifenoloxidase, nos extratos das plantas com 19 dias, demonstrou ser baixa (Figura 16). Na avaliação realizada nas plantas com 30 dias sem estresse,

o tratamento AAS mostrou-se superior em relação aos outros tratamentos, enquanto nas plantas com estresse, o tratamento com células de levedura foi o que apresentou maior valor médio. Apesar de menor, em relação ao tratamento com o uso de AAS, em plantas tratadas com células de levedura e sem o estresse biótico, a atividade da enzima também se manteve alta, quando comparadas com as plantas do tratamento controle. Apesar das variações observadas nos valores médios dos tratamentos, a análise estatística mostrou não haver diferenças entre os tratamentos (Tabela 4).



**Figura 16.** Atividade da enzima polifenoloxidase nos extratos vegetais de plantas de milho.

A atividade da polifenoloxidase está relacionada, principalmente, com a senescência de tecidos infectados por meio da oxidação de compostos fenólicos. Os fenóis presentes nos ferimentos são oxidados em quinonas, composto que possui ação antimicrobiana. Quanto maior a atividade oxidativa, maior é o estímulo para aumento desta enzima (CAMPOS; SILVEIRA, 2003).

**Tabela 4.** Atividade de polifenoloxidase em plantas de milho.

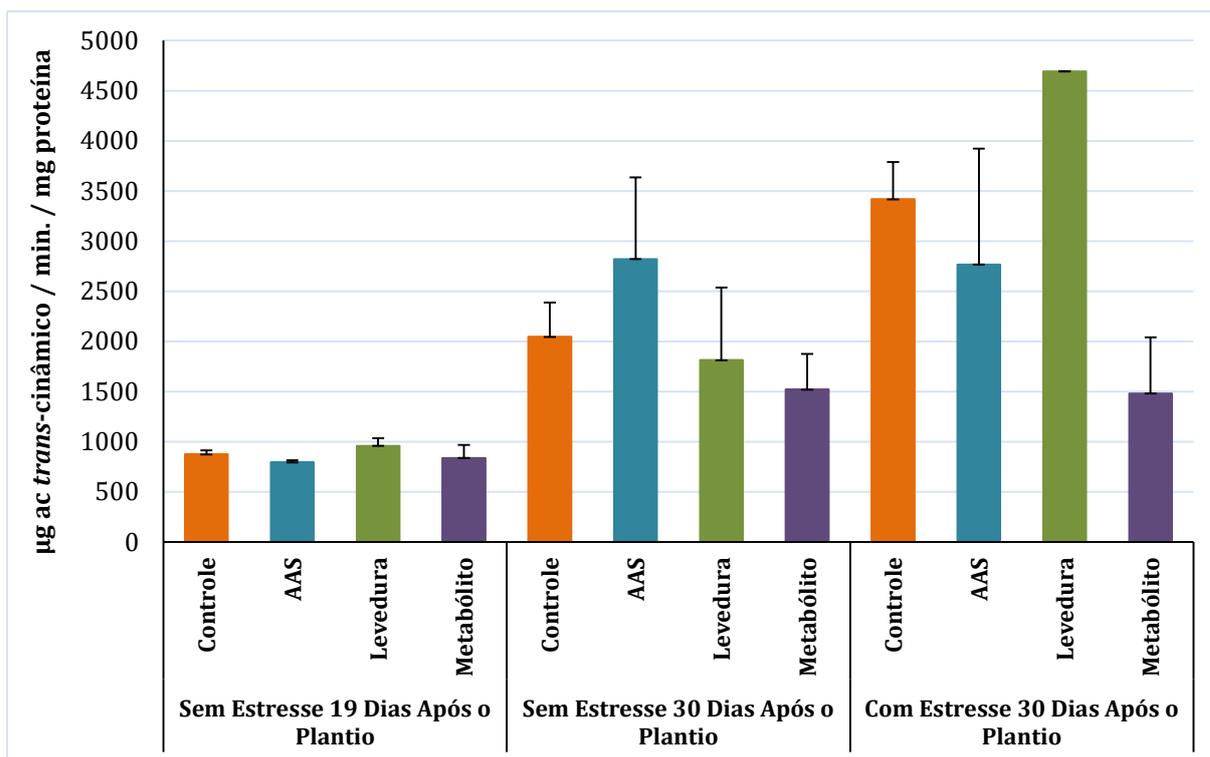
Tratamento	Dias Após o Plantio	Estresse	Polifenoloxidase
Controle	19	Não	0,41 a
	30	Não	0,07 a
	30	Sim	0,15 a
AAS	19	Não	0,08 a
	30	Não	0,62 a
	30	Sim	0,36 a
Levedura	19	Não	0,20 a
	30	Não	0,41 a
	30	Sim	0,80 a
Metabólito	19	Não	0,05 a
	30	Não	0,25 a
	30	Sim	0,34 a
CV (%)			88,34

Teste de Tukey. As médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si. CV% = coeficiente de variação em %.

Campos *et al.* (2004) avaliou a atividade de peroxidase e polifenoloxidase em cultivares de feijão pulverizados com AAS e microrganismos indutores, e observou que em plantas tratadas houve crescimento na atividade destas enzimas após a inoculação de patógenos. Ainda segundo o autor, a atividade de peroxidase e polifenoloxidase têm sido associadas a diversos processos relacionados ao sistema de defesas das plantas, afetando a hipersensibilidade, lignificação e ação antimicrobiana. Nas plantas em geral, como no milho, a peroxidase atua na lignificação, reforçando a parede celular e aumentando a resistência da planta à degradação enzimática (SILVA; PASCHOLATI; BEDENDO, 2007). A polifenoloxidase também está intimamente relacionada aos mecanismos de defesa, atuando por meio de processos oxidativos em ferimentos (BARROS *et al.*, 2010).

#### 4.3.3 Fenilalanina amônia-liase

A atividade de fenilalanina amônia-liase se mostrou baixa nos extratos das plantas colhidas após 19 dias do plantio (Figura 17), como também observado para as outras enzimas analisadas. Em plantas com 30 dias, sem estresse, a atividade da enzima tratada com AA se mostrou maior em relação aos outros tratamentos. Em plantas com estresse, a atividade da enzima se mostrou maior em plantas tratadas com células de levedura.



**Figura 17.** Atividade da enzima fenilalanina amônia-liase nos extratos vegetais de plantas de milho.

De acordo com Pascholati *et al.* (1986), a fenilalanina amônia-liase é uma enzima intensamente estudada em plantas e que atua no metabolismo de compostos fenólicos, sendo a enzima-chave na regulação da rota dos fenilpropanóides. Além disso, atua como catalisadora da L-fenilalanina em ácido *trans*-cinâmico e amônia; a regulação do acúmulo de fenóis se mostra eficaz em resposta a infecção e fermentos.

Neste trabalho, dentre os tratamentos avaliados, é possível notar que as plantas com 30 dias, tratadas com as células de levedura, que receberam o estresse causado pela infecção pelo fitopatógeno, apresentaram atividade da enzima estatisticamente superior aos outros tratamentos (Tabela 5). O aumento significativo da atividade enzimática proporcionada pelo tratamento com células de levedura confirma a hipótese de que a levedura *T. globosa* tem ação como indutora de resistência sistêmica nas plantas de milho, promovendo controle contra os prejuízos causados pelo patógeno *F. verticillioides*.

**Tabela 5.** Atividade de fenilalanina amônia-liase em plantas de milho.

Tratamento	Dias Após o Plantio	Estresse	Fenilalanina Amônia-liase
Controle	19	Não	874,89 d
	30	Não	2046,66 bcd
	30	Sim	3418,61 ab
AAS	19	Não	795,50 d
	30	Não	2821,41 bc
	30	Sim	2766,54 bc
Levedura	19	Não	958,91 d
	30	Não	1813,85 cd
	30	Sim	4693,80 a
Metabólito	19	Não	838,99 d
	30	Não	1521,05 cd
	30	Sim	1481,10 cd
CV (%)			25,95

Teste de Tukey. As médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si. CV% = coeficiente de variação em %.

A utilização de elicitores abióticos como o AAS e bióticos como microrganismos direcionados à resistência sistêmica, vem sendo amplamente discutida na literatura. O AAS, quando aplicado externamente na planta, induz o aumento da síntese do ácido salicílico, protegendo a planta contra os ataques dos fitopatógenos (KHAN *et al.*, 2003). Silva e Pascholati (1992) demonstraram o efeito de suspensões de células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* no controle de *Colletotrichum graminicola* e *Exserohilum turcicum* em plantas de milho.

O controle biológico relacionado a indução de resistência apresenta comprovação com rizobactérias. A indução de resistência sistêmica induzida por rizobactérias atua por meio de sinais translocáveis produzidos pelos microrganismos que induzem a proteção de tecidos distantes da raiz. Quando rizobactérias promotoras de crescimento vegetal, como *Pseudomonas* spp., colonizam a raiz das plantas, há a síntese de sinalizadores que geram novas rotas metabólicas que podem ativar genes promotores de compostos de defesa (VAN LOON *et al.*, 1998). Além de rizobactérias, leveduras amplamente utilizadas na indústria, como a *Saccharomyces cerevisiae* demonstraram ação eficaz na indução de resistência em tomateiros contra à infecção causa por *Xanthomonas gardneri* (AGUIAR, 2016). As alterações enzimáticas ocorridas no sistema de defesa das plantas podem se dar pelo reconhecimento da planta às leveduras e seus metabólitos, alterando seu metabolismo normal em resposta aos possíveis invasores (RONCATTO; PASCHOLATI, 1998).

Os microrganismos promotores de crescimento vegetal (MPCV) podem ser utilizados

como inoculantes a partir de produtos biológicos ou podem ser utilizados para a produção de moléculas bioestimulantes (IGNATOVA *et al.*, 2015). A levedura *T. globosa* é um MPCV, pois há trabalhos que mostram sua capacidade de promover o crescimento vegetal (CABRINI; SALA; MAGRI, 2019), por meio da produção do fito-hormônio AIA (ALBERTINI 2017; OLIVEIRA, 2019), solubilização de fosfato (ROCHA, 2017), e do controle biológico de fitopatógenos (ROSA *et al.*, 2010; BOSQUEIRO, 2019). A partir dos resultados obtidos nesse trabalho, é possível observar que a levedura *T. globosa* (6S01) também pode apresentar mecanismos que atuam no sistema de defesa das plantas, induzindo resistência sistêmica contra o patógeno *F. verticillioides* em plantas de milho.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

A utilização de microrganismos na agricultura como promotores de crescimento vegetal vem sendo amplamente estudada para melhorar a qualidade das plantas nos cultivares. No entanto, os mecanismos que tais microrganismos produzem muitas vezes são estabelecidos em ensaios laboratoriais. Sabe-se que o solo é um ambiente rico em biodiversidade e nutrientes, porém, com o alto índice de utilização de agroquímicos e culturas sem rotatividade, drásticos impactos podem comprometer a qualidade do solo. Por isso, a utilização de produtos biológicos capazes de contribuir para a agricultura sem agredir o ambiente está ganhando espaço na literatura, no comércio e na agricultura. Contudo, deve-se estar atento ao produto utilizado para que não haja desequilíbrio no ecossistema ali estabelecido. A utilização de leveduras se apresenta com potencial para a produção de produtos biológicos, uma vez que leveduras rizosféricas habitam naturalmente as plantas.

A partir desse estudo, foi possível considerar que a levedura *T. globosa* estabeleceu mecanismos capazes de atuarem no sistema de defesa da planta, impedindo a propagação da infecção por todo sistema vascular. Por meio dos resultados obtidos, observamos que nas plantas tratadas com células da levedura, apesar de não promoverem um maior desenvolvimento de parte aérea e raiz, foi capaz de atenuar os sintomas de podridão após infecção pelo fitopatógeno *F. verticillioides*. Além disso, as análises enzimáticas demonstraram alta atividade para peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase nas plantas tratadas com células de levedura e submetidas ao estresse pelo fungo.

Portanto, a aplicação de células da levedura *T. globosa* se mostrou eficaz como indutora de resistência sistêmica em milho em ensaios em casa de vegetação. No entanto, são necessários novos estudos que possibilitem o aprofundamento dos mecanismos empregados pela levedura

na ação de indução de resistência concomitante à ação de promoção de crescimento vegetal. Além disso, estudos que busquem estabelecer e viabilizar o emprego dessa levedura na agricultura são fundamentais para promover o aumento da produtividade de culturas de interesse econômico a partir do viés sustentável.

## 6 REFERÊNCIAS

- AGUIAR, T. **Frações polissacarídicas de fungos (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pleurotus ostreatus* e *Lentinula edodes*) na indução de resistência em tomateiro (*Solanum lycopersicon*) contra *Xanthomonas gardneri***. Tese (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal de Santa Catarina, 2016.
- ALBERTINI, J. **Produção de ácido indol acético *in vitro* por *Torulaspora globosa***. 2017. 55p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2017.
- BARROS, F. C. *et al.* Induction of Resistance in Plants Against Phytopathogens. **Biosci. J.**, v. 26, n. 2, p. 231–239, 2010.
- BERTON, R. S.; PRATT, P. F.; FRANKENBERGER, W. T. Phosphorus availability in soils amended with organic materials, estimated by three chemical methods and two enzyme activities. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 21, n. 4, p. 617-624, 1997.
- BONALDO, S. M. *et al.* **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**, Piracicaba: FEALQ, p. 11-28, 2005.
- BORÉM, A.; GIÚDICE, M. P. Cultivares transgênicos. *In*: GALVÃO, J. C. C.; MIRANDA, G. V. (Ends), **Tecnologias de produção do milho**. Editora UFV – Universidade Federal de Viçosa, 85p. 2004.
- BOSQUEIRO, A.; **Leveduras como agentes de controle de *Alternaria alternata* em tomates no pós-colheita: mecanismos, resistência a estresses e formulação**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados) – Universidade Federal de São Carlos, 2019.
- BRADFORD, M. A. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 1976.
- BURD, G. I.; DIXON, D. G.; GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 237-245, 2000.
- BURKETOVA, L. *et al.* Bio-based resistance inducers for sustainable plant protection against pathogens. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 994–1004, 2015.
- CABRINI, P. G.; SALA, F. C.; MAGRI, M. M. R. *Torulaspora globosa*: levedura rizosférica promotora de crescimento de alface. **Horticultura Brasileira**, v. 37, n. 3, 2019.
- CAMPOS, I. H. *et al.* Manejo integrado de doenças do morangueiro. *In*: SIMPÓSIO NACIONAL DO MORANGO, 3., Pelotas, 2006.

CAMPOS, A. D.; FERREIRA, A. G.; HAMPE, M. M. V.; ANTUNES, I. F.; BRANÇÃO, N.; SILVEIRA, E. P.; OSÓRIO, V. A.; AUGUSTIN, E. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 2004.

CAMPOS, A. D.; SILVEIRA, E. M. L. **Metodologia para determinação da peroxidase e da polifenoloxidase em plantas**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Comunicado Técnico. Pelotas – RS, 2003.

CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S.; PINTO, N. F. J. A. **Doenças na cultura do milho**. Embrapa – circular técnica, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/490415/1/Circ83.pdf>. Acesso em: 26 jun. 2021.

CASTIGLIONI, P. *et al.* Bacterial RNA chaperones confer abiotic stress tolerance in plants and improved grain yield in maize under water-limited conditions. **Plant Physiology**, v. 147, n. 2, p. 446-455, 2008.

CLOETE, K. J. *et al.* Evidence of symbiosis between the soil yeast *Cryptococcus laurentii* and a Sclerophyllous medicinal shrub, *Agathosma betulina* (Berg.) Pillans. **Microbial Ecology**, v.57, p.624-632, 2009.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Primeiro levantamento da safra 2019/20 de grãos indica produção de 245 milhões de toneladas**. 2021. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>. Acesso em: 15 de mar 2021.

CONTINI, E. *et al.* **Série Desafios do Agronegócio Brasileiro (NT2) Milho-Characterização e Desafios Tecnológicos**. p. 1–45, 2019.

DE ARAUJO, F. F.; MENEZES, D. Indução de resistência a doenças foliares em tomateiro por indutores biótico (*Bacillus subtilis*) e abiótico (Acibenzolar-S-Metil). **Summa Phytopathologica**, v. 35, n. 3, p. 169–172, 2009.

DE OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J. I. Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal. **Embrapa Agrobiologia-Documentos (INFOTECA-E)**, 2003.

DUANGMAL, K.; APENTEN, R. K. O. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). **Food Chemistry**. 1999.

DURRANT, W. E.; DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 42, p. 185-209, 2004.

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

FAO (Food and Agriculture Organization) – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura. **Brasil deve se tornar o segundo maior exportador global de milho**. 2019. Disponível em: <http://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/pt/c/1194128/>. Acesso em: 15 mar. 2021.

FIGUEIRA, E. L. Z. *et al.* Milho: Riscos associados à contaminação por *Fusarium verticillioides* e fumonisinas. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 24, n. 2, p. 359–377, 2003.

FU, Z. Q.; DONG, X. Systemic Acquired Resistance: turning local infection into global defense. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, n. 1, p. 839–863, 2013.

GLICK, B. R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v.14, n.12, p. 109-117, 1995.

GOMES, E. A. *et al.* Microrganismos promotores de crescimento de plantas. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2016. 51 p.

IDRIS, E. E.; IGLESIAS, D. J.; TALON, M.; BORRIS, R. Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 20, n. 6, p. 619-626, 2007.

IGNATOVA, L. V.; BRAZHNKOVA, Y. V.; BERHANOVA, R. Z.; MUKASHEVA, T. D. Plant growth-promoting and antifungal activity of yeasts from dark chestnut soil. **Microbiological Research**, p. 78-83, 2015.

KHAN, W.; PRITHIVIRAJ, B.; SMITH, D. L. Photosynthetic responses of corn and soybean to foliar application of salicylates. **Journal of Plant Physiology**, v. 160, n. 5, p. 485–492, 2003.

KUC, J. A.; TUZUN, S. Proposed Definitions Related to Induced Disease Resistance. **Biocontrol Science and Technology**, v. 2, n. 4, p. 349–351, 1992.

LANZA, F. E. Prevalência de *Fusarium verticillioides* e manejo de grãos ardidos e fumonisinas em milho. Tese (doutorado). Universidade Federal de Viçosa, 2013.

LINO, C. M., SILVA, L. J. G., PENA, A. S. Fumonisin: presença em alimentos, implicações na saúde e aspectos legislativos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v. 99, n. 552, p. 181-192, 2004.

LUSSO, M. F. G.; PASCHOLATI, S. F. Activity and isoenzymatic pattern of soluble peroxidases in maize tissues after mechanical injury or fungal inoculation. **Summa Phytopathologica**, 1999.

MEDINA, A. *et al.* Improvement of soil characteristics and growth of *Dorycnium pentaphyllum* by amendment with agrowastes and inoculation with AM fungi and/or the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Chemosphere**, v. 56, p. 449-456, 2004.

METWALLY, A. *et al.* Salicylic Acid Alleviates the Cadmium Toxicity in barley Seedlings. **Plant Physiology**, v. 132, n. 1, p. 272-281, 2003.

- MIRANDA, R. A. Uma história de sucesso da civilização. **A Granja**, v. 74, n. 829, p. 24-27, jan. 2018.
- MUNKVOLD, G.P. Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears. **European Journal of Plant Pathology**, v.109, p.705-713, 2003.
- NARUSAKA, M. *et al.* Yeast cell wall extract induces disease resistance against bacterial and fungal pathogens in *Arabidopsis thaliana* and Brassica crop. **PLoS ONE**, v. 10, n. 1, p. 1–14, 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.
- OLIVEIRA, T. B. *et al.* Rhizosphere yeast *Torulaspora globosa* with plant growth promotion traits and improvement of the development of tomato seedlings under greenhouse conditions. **African Journal of Agricultural Research**, v. 14, n. 22, p. 935-942, 2019.
- ORABI, S. A.; DAWOOD, M. G.; SALMAN, S. R. Comparative study between the physiological role of hydrogen peroxide and salicylic acid in alleviating the harmful effect of low temperature on tomato plants grown under sand-ponic culture. **Scientia Agriculturae**, n. 9, p. 49-59, 2015.
- PASCHOLATI, S. F.; NICHOLSON, R. L.; BUTLER, L. G. Phenylalanine Ammonia-Lyase Activity in Anthocyanin Accumulation in Wounded Maize Mesocotyls. **Paul Parey Scientific**, 1986.
- PÉREZ-MONTAÑO, F. *et al.* Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. **Microbiological research**, 169.5: 325-336, 2014.
- PIETERSE, C. M. J. *et al.* Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. **Annual Review of Phytopathology**, v. 52, n. 1, p. 347–375, 2014.
- PORAT, R. *et al.* Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by  $\beta$ -aminobutyric acid. **European Journal of Plant Pathology**, v. 109, n. 9, p. 901–907, 2003.
- ROCHA, R. K. Solubilização *in vitro* de Fosfato por *Torulaspora globosa*. 71p. **Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados) – Universidade Federal de São Carlos**, Araras, 2017.
- RONCATTO, M. C.; PASCHOLATI, S. F. Alterações na atividade e no perfil eletroforético da peroxidase em folhas de milho (*Zea mays*) e sorgo (*Sorghum bicolor*) tratadas com *Saccharomyces cerevisiae*. **Scientia Agricola**, v. 55, p. 395-402, 1998.
- ROSA, M. M. *et al.* Evaluation of the biological control by yeast *Torulaspora globosa* against *Colletotrichum sublineolum* in sorghum. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p.1491-1502, 2010.

SALOMON, D.; SESSA, G. Biotechnological strategies for engineering plants with durable resistance to fungal and bacterial pathogens. **Plant Biotechnology and Agriculture: Prospects for the 21st Century**, n. 1, 2012.

SILVA, D. D. DA *et al.* Micotoxinas em Cadeias Produtivas do Milho: Riscos à Saúde Animal e Humana. **Embrapa Milho e Sorgo**, p. 27, 2015.

SILVA, R. F. S.; PASCHOLATI, S. F.; BEDENDO, I. P. Indução de Resistência em tomateiro por extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*. **Fitopatologia Brasileira**, 2007.

SILVA, R. F.; PASCHOLATI, S. F.; BEDENDO, I. P. I. P. Indução de resistência em tomateiro por extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*. **Fitopatologia Brasileira**. 2007.

SILVA, S. R.; PASCHOLATI, S. F. *Saccharomyces cerevisiae* protects maize plants, under greenhouse conditions, against *Colletotrichum graminicola*. **Journal of Plant Disease and Protection**, v. 99, p. 159-67, 1992.

SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Campinas: Instituto Agronômico, 2007, 312p. Disponível em: <http://www.iac.agricultura.sp.gov.br/publicacoes/arquivos/microbiota.pdf>. Acesso em: 29 jun. 2021.

SYED-AB-RAHMAN, S. F. *et al.* Soil bacterial diffusible and volatile organic compounds inhibit *Phytophthora capsici* and promote plant growth. **Science of The Total Environment**, v. 692, p. 267–280, 2019.

UMESHA, S. Phenylalanine ammonia lyase activity in tomato seedlings and its relationship to bacterial canker disease resistance. **Phytoparasitica** 34:68-71. 2006.

VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 36, p.453-483, 1998.

VITOUSEK, P. M. *et al.* Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. **Biogeochemistry**, v.57/58, n.1, p.1-45, 2002.

ZHANG, H. *et al.* Soil bacteria confer plant salt tolerance by tissue-specific regulation of the sodium transporter HKT1. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 21, n.6, p. 737-744, 2008.

ZIPFEL, C. Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 20, n. 1, p. 10–16, 2008.