



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE CULTIVARES DE ALFACE PELA
LEVEDURA RIZOSFÉRICA *Torulaspota globosa*

PALOMA GARCIA CABRINI

Araras
2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE CULTIVARES DE ALFACE PELA
LEVEDURA RIZOSFÉRICA *Torulaspora globosa*

PALOMA GARCIA CABRINI

ORIENTADOR: PROF. DR. MÁRCIA MARIA ROSA MAGRI
CO-ORIENTADOR: PROF. DR. FERNANDO CESAR SALA

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Produção
Vegetal e Bioprocessos Associados
como requisito parcial à obtenção do
título de MESTRE EM PRODUÇÃO
VEGETAL E BIOPROCESSOS
ASSOCIADOS

Araras
2018

GARCIA CABRINI, PALOMA

PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE CULTIVARES DE ALFACE
PELA LEVEDURA RIZOSFÉRICA *Torulaspora globosa* / PALOMA
GARCIA CABRINI. -- 2018.

96 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, campus
Araras, Araras

Orientador: Márcia Maria Rosa Magri

Banca examinadora: Fabricio Dário Cassán, Silvana Perissatto Meneghin,
Fernando César Sala

Bibliografia

1. Micro-organismos Promotores de Crescimento Vegetal. 2. Olerícolas.
3. Metabólitos Microbianos. I. Orientador. II. Universidade Federal de São
Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

Bibliotecário(a) Responsável: Maria Helena Sachi do Amaral – CRB/8 7083



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Agrárias
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Paloma Garcia Cabrini, realizada em 22/08/2018:

Profa. Dra. Marcia Maria Rosa Magri
UFSCar

Prof. Dr. Fabricio Dario Cassan
UNRC

Profa. Dra. Silvana Perissatto Meneghin
UFSCar

Prof. Dr. Fernando César Sala
UFSCar

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Adriana e Sandoval, por sempre me apoiarem em todos os momentos de minha vida, à minha irmã, Michelle, por estar sempre ao meu lado, e aos meus sobrinhos, Nicolás, Henrique e Vinícius, pelo carinho.

À minha orientadora, prof.^a Dr.^a Márcia Maria Rosa Magri, por ter sido muito mais que uma orientadora, pela amizade, companheirismo e paciência.

Ao meu co-orientador, prof. Dr. Fernando César Sala, pela confiança e ensinamentos.

À equipe do GEHORT durante os ensaios em campo e casa de vegetação, pelo suporte.

Ao Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM)/ CCA-UFSCar, pela estrutura e apoio durante o desenvolvimento do projeto.

À Stoller do Brasil, por permitir que esse trabalho acontecesse, e pela estrutura e apoio.

Aos amigos da Stoller, que sem eles nada disso seria possível, em especial, Daniela Scarabel, que me apoiou e incentivou em todo meu desenvolvimento profissional e pessoal nos últimos dez anos, Jéssica Horwat, pela amizade e apoio durante os últimos anos, Jonata Rafael Freshi, pelo apoio e ideias durante o desenvolvimento da parte experimental *in vitro*.

Aos amigos da vida, que me apoiaram e entenderam a ausência durante essa jornada, em especial, Rosiane Pires Costa, que se fez presente em muitos domingos de acompanhamento de experimentos na UFSCar.

À banca de qualificação e defesa, pelas sugestões importantes para a segunda fase do desenvolvimento do projeto e finalização da dissertação: prof.^a Dr.^a Sandra R.C. Antonini, prof.^a Dr.^a Silvana P. Meneghin, Dr.^a Ligianne Din Shirahigue e prof.^o Dr. Fabrício Dário Cassán.

SUMÁRIO

	Página
ÍNDICE DE QUADROS.....	i
ÍNDICE DE TABELAS.....	ii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
INTRODUÇÃO.....	01
OBJETIVOS.....	04
1. Objetivo geral.....	04
2. Objetivos específicos.....	04
REVISÃO DA LITERATURA.....	05
1. Alface (<i>Lactuca sativa</i> L).....	05
2. Micro-organismos promotores de crescimento vegetal (MPCV)..	07
3. Leveduras promotoras de crescimento vegetal.....	09
4. Uso de micro-organismos promotores de crescimento vegetal em espécies olerícolas	10
LITERATURA CITADA.....	13
CAPÍTULO 1. <i>Torulaspota globosa</i>: levedura rizosférica que promove crescimento de alface em condições de produção de muda e pós- transplante em campo.....	25
1. Resumo.....	25
2. Introdução.....	26
3. Materiais e Métodos.....	27
3.1 Material Biológico.....	27
3.1.1 Levedura rizosférica <i>Torulaspota globosa</i> (5S55).....	27
3.1.2 Alface (<i>Lactuca sativa</i> L.) cv Crocantela.....	28
3.2 Avaliação do desenvolvimento de mudas de alface a partir de sementes inoculadas com <i>T. globosa</i> (5S55).....	28
3.3. Avaliação da produção de alface em campo a partir de	

mudas inoculadas com <i>T. globosa</i> (5S55).....	30
3.4. Análise estatística.....	31
4. Resultados e Discussão.....	32
4.1. Avaliação das mudas de alface cultivadas em casa-de-vegetação.....	32
4.2. Avaliação das plantas de alface no pós-transplante.....	36
5. Discussão.....	40
6. Conclusões.....	43
7. Literatura citada.....	43

CAPÍTULO 2. Avaliação da germinação e desenvolvimento inicial de alface inoculado com levedura rizosférica *Torulaspota globosa* e seus metabólitos em condições controladas.....

1. Resumo.....	48
2. Introdução.....	49
3. Materiais e Métodos.....	50
3.1. Material biológico.....	50
3.1.1. Levedura rizosférica <i>Torulaspota globosa</i> (linhagem 5S55).....	50
3.1.2. Alface (<i>Lactuca sativa</i> L.) cv. Crocantela e cv. Valentina.....	51
3.2. Preparo do inóculo (células) ou produto derivado do cultivo (metabólito) de <i>Torulaspota globosa</i> (5S55).....	51
3.3. Tratamento das sementes de alface com células e/ou metabólito do cultivo de <i>T. globosa</i> (5S55).....	52
3.3.1. Avaliação da germinação das sementes de alface tratadas com células ou metabólitos do cultivo de <i>T. globosa</i>	52
3.3.2. Avaliação do desenvolvimento inicial de alface a partir de sementes tratadas com células ou metabólitos do cultivo de <i>T. globosa</i>	53
3.3.3. Avaliação do desenvolvimento de pelos radiculares nas plântulas de alface a partir de sementes tratadas	

	com células ou metabólitos do cultivo de <i>T. globosa</i> sob microscópio.....	55
3.4.	Tratamento de sementes de alface (cv Valentina) com células e/ou metabólito do cultivo de <i>T. globosa</i>, e/ou com células de <i>Azospirillum brasilense</i>.....	55
3.5.	Análise estatística.....	56
4.	Resultados.....	57
4.1.	Avaliação da germinação das sementes de alface tratadas com células ou metabólitos do cultivo de <i>T. globosa</i>.....	57
4.2.	Avaliação do desenvolvimento inicial de alface a partir de sementes tratadas com células ou metabólitos do cultivo de <i>T. globosa</i>.....	58
4.3.	Avaliação do desenvolvimento de pelos radiculares sob microscópio de plântulas de alface a partir de sementes tratadas com células e/ou metabólitos do cultivo de <i>T. globosa</i>	64
4.4.	Tratamento de sementes de alface (cv Valentina) com células e/ou metabólito do cultivo de <i>T. globosa</i>, e/ou com células de <i>Azospirillum brasilense</i>.....	68
5.	Discussão.....	72
6.	Conclusões.....	76
7.	Literatura citada.....	76
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	81

ÍNDICE DE QUADROS

	Página
Capítulo 1	
Quadro 1. Descrição dos tratamentos de inoculação de leveduras em sementes e plântulas de alface cv. Crocantela.....	30
Quadro 2. Delineamento experimental em blocos ao acaso utilizado no ensaio.....	31

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Capítulo 2	
Tabela 1. Tratamentos utilizados nos ensaios de crescimento inicial de alface com levedura e metabólitos.....	51
Tabela 2. Tratamentos utilizados nos ensaios de crescimento inicial de alface com levedura, metabólitos e <i>Azospirillum brasilense</i>	56
Tabela 3. Porcentagem de germinação e índice de velocidade de germinação de sementes de alface da cultivar Valentina.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Capítulo 1	
Figura 1. Altura média das mudas de alface cultivadas em casa-de-vegetação.....	32
Figura 2. Comprimento médio de raiz das mudas de alface cultivadas em casa-de-vegetação.....	32
Figura 3. Número médio de folhas das mudas de alface cultivadas em casa-de-vegetação.....	33
Figura 4. Largura média das folhas das mudas de alface cultivadas em casa-de-vegetação.....	34
Figura 5. Comprimento médio das folhas das mudas de alface cultivadas em casa-de-vegetação.....	34
Figura 6. Peso fresco médio da parte aérea das mudas de alface cultivadas em casa-de-vegetação.....	35
Figura 7. Peso fresco médio de raiz das mudas de alface cultivadas em casa-de-vegetação.....	35
Figura 8. Peso seco médio da parte aérea das mudas de alface cultivadas em casa-de-vegetação.....	36
Figura 9. Peso seco médio de raiz das mudas de alface cultivadas em casa-de-vegetação.....	36
Figura 10. Altura média da parte aérea de plantas de alface transplantadas para o campo.....	37
Figura 11. Número médio de folhas de plantas de alface transplantadas para o campo.....	38
Figura 12. Comprimento médio das folhas de plantas de alface transplantadas para o campo.....	38
Figura 13. Largura média das folhas de plantas de alface transplantadas para o campo.....	39
Figura 14. Comprimento médio de caule de plantas de alface transplantadas para o campo.....	39
Figura 15. Peso fresco médio da parte aérea de plantas de alface transplantadas para o campo.....	40

Figura 16. Peso seco médio da parte aérea de plantas de alface transplantadas para o campo.....	40
--	----

Capítulo 2

Figura 1. Caixa tipo gerbox com 25 sementes de alface da cultivar Crocantela.	52
Figura 2. Plantas após transplante para meio de cultura MS.....	54
Figura 3. Imagens obtidas com scanner para plantas e posteriormente analisadas pelos softwares Winrhizo® e Winfolia®. (A) Tratamento 1, Cv. Valentina; (B) Tratamento 5, Cv. Valentina.....	54
Figura 4. Plantas com germinação e desenvolvimento em meio MS em condições gnotobióticas (A). Cv. Valentina após 5 dias de semeadura, antes do desbaste (B). Planta no dia da avaliação.....	56
Figura 5. Área Foliar (AF). T1- Tratamento Controle; T2 (+) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano; T3 (+) Levedura (-) Metabólito (-) Triptofano; T4 (-) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano; T5 (+) Levedura (+) Metabólito (+) Triptofano; T6 (+) Levedura (-) Metabólito (+) Triptofano; T7 (-) Levedura (+) Metabólito (+) Triptofano. Letras maiúsculas representam comparações entre tratamentos da cv. Crocantela e letras minúsculas, comparações entre tratamentos da cv. Valentina.....	59
Figura 6. Volume de Raiz (VR). T1- Tratamento Controle; T2 (+) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano; T3 (+) Levedura (-) Metabólito (-) Triptofano; T4 (-) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano; T5 (+) Levedura (+) Metabólito (+) Triptofano; T6 (+) Levedura (-) Metabólito (+) Triptofano; T7 (-) Levedura (+) Metabólito (+) Triptofano. Letras maiúsculas representam comparações entre tratamentos da cv. Crocantela e letras minúsculas, comparações entre tratamentos da cv. Valentina.....	60
Figura 7. Número de Pontas de Raiz (NPZ). T1- Tratamento Controle; T2 (+) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano; T3 (+) Levedura (-) Metabólito (-) Triptofano; T4 (-) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano; T5 (+) Levedura (+) Metabólito (+) Triptofano; T6 (+) Levedura (-) Metabólito (+) Triptofano; T7 (-) Levedura (+) Metabólito (+) Triptofano. Letras maiúsculas representam comparações entre tratamentos da cv. Crocantela e letras minúsculas, comparações entre tratamentos da cv. Valentina.....	60
Figura 8. Diâmetro de Raiz (DR). T1- Tratamento Controle; T2 (+) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano; T3 (+) Levedura (-) Metabólito (-) Triptofano; T4 (-) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano; T5 (+) Levedura (+) Metabólito (+) Triptofano; T6 (+) Levedura (-) Metabólito (+) Triptofano; T7 (-) Levedura (+) Metabólito (+) Triptofano. Letras maiúsculas representam comparações entre tratamentos da cv. Crocantela e letras minúsculas, comparações entre tratamentos da cv. Valentina.....	61

Figura 9. Área de Raiz (AR). T1- Tratamento Controle; T2 (+) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano; T3 (+) Levedura (-) Metabólito (-) Triptofano; T4 (-) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano; T5 (+) Levedura (+) Metabólito (+) Triptofano; T6 (+) Levedura (-) Metabólito (+) Triptofano; T7 (-) Levedura (+) Metabólito (+) Triptofano. Letras maiúsculas representam comparações entre tratamentos da cv. Crocantela e letras minúsculas, comparações entre tratamentos da cv. Valentina..... 61

Figura 10. Comprimento de Raiz (CR). T1- Tratamento Controle; T2 (+) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano; T3 (+) Levedura (-) Metabólito (-) Triptofano; T4 (-) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano; T5 (+) Levedura (+) Metabólito (+) Triptofano; T6 (+) Levedura (-) Metabólito (+) Triptofano; T7 (-) Levedura (+) Metabólito (+) Triptofano. Letras maiúsculas representam comparações entre tratamentos da cv. Crocantela e letras minúsculas, comparações entre tratamentos da cv. Valentina..... 62

Figura 11. Meristema radicular e pêlos radiculares de plântulas de alface da cultivar Crocantela. T1- Tratamento Controle; T2 (+) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano; T3 (+) Levedura (-) Metabólito (-) Triptofano; T4 (-) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano; T5 (+) Levedura (+) Metabólito (+) Triptofano; T6 (+) Levedura (-) Metabólito (+) Triptofano; T7 (-) Levedura (+) Metabólito (+) Triptofano. Foto obtida de microscópio óptico..... 64

Figura 12. Meristema radicular e pêlos radiculares de plântulas de alface da cultivar Valentina. T1- Tratamento Controle; T2 (+) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano; T3 (+) Levedura (-) Metabólito (-) Triptofano; T4 (-) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano; T5 (+) Levedura (+) Metabólito (+) Triptofano; T6 (+) Levedura (-) Metabólito (+) Triptofano; T7 (-) Levedura (+) Metabólito (+) Triptofano. Foto obtida de microscópio óptico..... 65

Figura 13. Área foliar (AF) / Cultivar Valentina. T1- Tratamento Controle; T2 (+) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano; T3 (+) Levedura (-) Metabólito (-) Triptofano; T4 (-) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano; T5 (+) Levedura (+) Metabólito (+) Triptofano; T6 (+) Levedura (-) Metabólito (+) Triptofano; T7 (-) Levedura (+) Metabólito (+) Triptofano; T8 (-) Levedura (-) Metabólito (-) Triptofano (+) Cultivo *Azospirillum*; T9 (+) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano (+) Cultivo *Azospirillum*..... 66

Figura 14. Volume de raiz (VR) / Cultivar Valentina. T1- Tratamento Controle; T2 (+) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano; T3 (+) Levedura (-) Metabólito (-) Triptofano; T4 (-) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano; T5 (+) Levedura (+) Metabólito (+) Triptofano; T6 (+) Levedura (-) Metabólito (+) Triptofano; T7 (-) Levedura (+) Metabólito (+) Triptofano; T8 (-) Levedura (-) Metabólito (-) Triptofano (+) Cultivo *Azospirillum*; T9 (+) Levedura (+) Metabólito (-) 67

Triptofano (+) Cultivo *Azospirillum*.....

Figura 15. Número de pontas de raiz (NPR) / Cultivar Valentina. T1- Tratamento Controle; T2 (+) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano; T3 (+) Levedura (-) Metabólito (-) Triptofano; T4 (-) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano; T5 (+) Levedura (+) Metabólito (+) Triptofano; T6 (+) Levedura (-) Metabólito (+) Triptofano; T7 (-) Levedura (+) Metabólito (+) Triptofano; T8 (-) Levedura (-) Metabólito (-) Triptofano (+) Cultivo *Azospirillum*; T9 (+) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano (+) Cultivo *Azospirillum*..... 68

Figura 16. Diâmetro da raiz (DR) / Cultivar Valentina (ensaio 02). T1- Tratamento Controle; T2 (+) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano; T3 (+) Levedura (-) Metabólito (-) Triptofano; T4 (-) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano; T5 (+) Levedura (+) Metabólito (+) Triptofano; T6 (+) Levedura (-) Metabólito (+) Triptofano; T7 (-) Levedura (+) Metabólito (+) Triptofano; T8 (-) Levedura (-) Metabólito (-) Triptofano (+) Cultivo *Azospirillum*; T9 (+) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano (+) Cultivo *Azospirillum*..... 68

Figura 17. Área da raiz (AR) / Cultivar Valentina. T1- Tratamento Controle; T2 (+) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano; T3 (+) Levedura (-) Metabólito (-) Triptofano; T4 (-) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano; T5 (+) Levedura (+) Metabólito (+) Triptofano; T6 (+) Levedura (-) Metabólito (+) Triptofano; T7 (-) Levedura (+) Metabólito (+) Triptofano; T8 (-) Levedura (-) Metabólito (-) Triptofano (+) Cultivo *Azospirillum*; T9 (+) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano (+) Cultivo *Azospirillum*..... 69

Figura 18. Comprimento da raiz (CR) / Cultivar Valentina. T1- Tratamento Controle; T2 (+) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano; T3 (+) Levedura (-) Metabólito (-) Triptofano; T4 (-) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano; T5 (+) Levedura (+) Metabólito (+) Triptofano; T6 (+) Levedura (-) Metabólito (+) Triptofano; T7 (-) Levedura (+) Metabólito (+) Triptofano; T8 (-) Levedura (-) Metabólito (-) Triptofano (+) Cultivo *Azospirillum*; T9 (+) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano (+) Cultivo *Azospirillum*..... 69

PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE CULTIVARES DE ALFACE PELA LEVEDURA RIZOSFÉRICA *Torulaspora globosa*

Autor: PALOMA GARCIA CABRINI

Orientador: Profa. Dra. MÁRCIA MARIA ROSA MAGRI

Co-orientador: Prof. Dr. FERNANDO CESAR SALA

RESUMO

O solo abriga grande diversidade microbiana, da qual a maior parte continua desconhecida, quanto a espécies, grupos microbianos e funções no ecossistema. Dentre os micro-organismos conhecidos que habitam o solo, um grupo se destaca como benéfico às atividades agrícolas: os micro-organismos promotores de crescimento vegetal (MPCV). São capazes de auxiliar o desenvolvimento das plantas através, principalmente, da produção de fitormônios, disponibilização de nutrientes e controle de fitopatógenos. Dentre os MPCV, as leveduras apresentam pouco destaque, por estarem em menor quantidade no solo. Trabalhos na literatura, porém, indicam que este grupo apresenta grande potencial, por apresentar ótimos resultados em experimentos *in vitro*, quanto aos principais mecanismos de estímulo ao desenvolvimento vegetal. Considerando o exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a germinação, desenvolvimento inicial de plântulas, mudas e plantas adultas de alface inoculados com a levedura rizosférica *Torulaspora globosa* e seus metabólitos. Para tanto o trabalho envolveu dois experimentos; o primeiro consistiu na inoculação de sementes e mudas de alface, da cultivar Crocantela, em condições de casa-de-vegetação, cultivadas em substrato e transplantadas ao campo. O segundo experimento consistiu avaliar, de forma mais controlada, a ação da levedura, de seus metabólitos e de triptofano na germinação e desenvolvimento inicial de alface (cultivars Crocante e Valentina) em condições de laboratório. Por último foi avaliada a ação da bactéria diazotrófica *Azospirillum brasilense*, de forma isolada e em associação com a levedura, no desenvolvimento da cultivar Valentina. Os resultados mostraram que para os ensaios de casa-de-vegetação e campo, a inoculação da levedura proporcionou mudas com menor comprimento de raiz, apesar de maior massa de raiz (sistema radicular menor e mais ramificado). As folhas se apresentaram mais largas e compridas, o que se refletiu em uma maior massa da parte aérea. A avaliação das plantas no pós-colheita mostrou que para as variáveis altura, número de folhas, comprimento e largura de folhas, e peso fresco de parte aérea, o tratamento não inoculado apresentou valores estatisticamente inferiores. Os resultados para os ensaios em condições controladas mostraram que o tratamento das sementes das cultivares Crocante e Valentina não afetou significativamente a germinação. As plântulas, porém, da cultivar Crocantela apresentaram raízes menores e com menor área quando tratadas com a levedura e seus metabólitos. Os metabólitos da levedura com triptofano (T7), por sua vez, proporcionaram maior diâmetro de raiz. Os dados obtidos pela cultivar Valentina mostraram que o tratamento com a levedura, seus metabólitos e adição de triptofano (T5) foi o que proporcionou os melhores resultados, com destaque para as variáveis volume e área de raiz, e número de pontas de raízes. Os tratamentos com adição de

triptofano (com levedura (T6) ou metabólitos (T7)) foram os que apresentaram os resultados menos satisfatórios para o desenvolvimento das plântulas. Foi possível observar que o tratamento 5 também mostrou ser o melhor no estímulo a produção de pêlos radiculares para a cultivar Valentina. A adição da bactéria *A. brasilense*, isolada e em co-inoculação com a levedura, não promoveu crescimento significativo das plântulas de alface da cultivar Valentina. A partir dos dados apresentados podemos observar que a inoculação das sementes e mudas com a levedura mostrou ser eficiente na promoção de crescimento de alface. Estudos relacionados à métodos de inoculação, formulações do inóculo, concentração de células e análise química dos metabólitos produzidos, porém, são imperativos para otimizar os resultados de promoção de crescimento e para o estabelecimento da tecnologia.

Palavras-chave: Micro-organismos Promotores de Crescimento Vegetal; Crocanta; Valentina; olerícolas; metabólitos microbianos

GROWTH PROMOTION OF LETTUCE VARIETIES BY RHIZOSPHERE YEAST *Torulaspora globosa*

Author: PALOMA GARCIA CABRINI

Adviser: Prof. Dr. MÁRCIA MARIA ROSA MAGRI

Co-adviser: Prof. Dr. FERNANDO CESAR SALA

ABSTRACT

The soil harbors great microbial diversity which remains unknown, as regards species, microbial groups and functions in the ecosystem. Among the known microorganisms that inhabit the soil, one group is described as beneficial to agricultural activities: the plant growth promoter microorganisms (PGPM). They are able to aid the development of plants through, mainly, the production of phytohormones, nutrients solubilization and control of phytopathogens. Among the PGPM, yeasts present slight prominence, because they are in less quantity in the soil. However, studies in the literature indicate that this group presents great potential, as it presents excellent results in *in vitro* experiments, regarding the main mechanisms of stimulus to plant development. Considering the above, the objective of this work was to evaluate the germination, initial development of seedlings, seedlings and adult lettuce plants inoculated with the rhizosphere yeast *Torulaspora globosa* and its metabolites. Two experiments were realized; the first consisted of the inoculation of seeds and lettuce seedlings of the Crocantela variety under greenhouse conditions, germinated in substrate and transplanted to the field. The second experiment consisted of evaluating, under laboratory controlled conditions, the action of yeast, its metabolites and tryptophan on germination and initial development of lettuce (Crocantela and Valentina varieties). Finally, the action of the diazotrophic bacterium *Azospirillum brasilense*, alone and co-inoculated with the yeast, was evaluated in the development of the Valentina variety. The results showed that for yeast and field trials, yeast inoculation provided seedlings with a lower root length, despite a higher root mass (smaller and more branched root system). The leaves appeared wider and longer, which was reflected in a larger mass of the aerial part. The evaluation of the plants at the post-harvest showed that for the variables height, leaf number, leaf length and width, and fresh weight of shoot, the noninoculated treatment had statistically lower values. The results for the trials under controlled conditions showed that the treatment of the seeds of the cultivars Crocante and Valentina did not affect significantly the germination. The seedlings, however, of the Crocantela variety showed roots smaller and with less area when treated with the yeast and its metabolites. The metabolites of the yeast with tryptophan (T7), in turn, provided a larger root diameter. The data obtained by the Valentina variety showed that the treatment with yeast, its metabolites and addition of tryptophan (T5) provided the best results, especially for volume, root area and number of root tips. The treatments with tryptophan addition (with yeast (T6) or metabolites (T7)) presented the least satisfactory results for the development of the seedlings. It was possible to observe that the treatment 5 also showed the best in stimulating the production of root hair for the Valentina variety. The addition of the *A. brasilense*, isolated and in co-inoculation with the yeast, did not promote significant growth of lettuce seedlings of the Valentina

variety. From the data presented we can observe that the inoculation of the seeds and seedlings with the yeast showed to be efficient in the promotion of lettuce growth. Studies related to inoculation methods, inoculum formulations, cell concentrations and chemical analysis of the metabolites produced, however, are imperative to optimize the results of growth promotion and the establishment of the technology.

Keywords: Plant Growth Promoter Microorganisms; Crocantela; Valentina; horticulture; microbial metabolites

INTRODUÇÃO

O solo é um ambiente extremamente complexo, que apresenta uma diversidade microbiana bastante elevada, caracterizada por diferentes tipos funcionais, que em equilíbrio são fundamentais a diferentes processos, entre eles na ciclagem de nutrientes e na proteção e auxílio ao desenvolvimento vegetal (BALDRIAN, 2016). A agricultura atual, no entanto, emprega uma grande quantidade de compostos químicos, como fertilizantes minerais e defensivos, os quais rompem com o equilíbrio do ecossistema edáfico, através da diminuição da biodiversidade, e consequente queda da resiliência do solo (NUROLITA et al., 2016). O emprego desses produtos, porém, é imprescindível, considerando que o processo de produção agrícola atual se apresenta altamente dependente de insumos que sustentam o processo produtivo, ao mesmo tempo em que agridem o ambiente (LAMICHHANE et al., 2016).

O estudo de processos naturais, com o emprego de micro-organismos autóctones capazes de proteger e auxiliar o desenvolvimento da planta apresenta-se como uma alternativa na busca de uma produção agrícola mais sustentável (ALAGUKANNAN e ASHOKKUMAR, 2015). O conhecimento das funções dos micro-organismos no solo, porém, continua sendo um desafio aos cientistas. É possível encontrar na literatura diversos trabalhos sobre micro-organismos promotores de crescimento vegetal (MPCV), porém não existem muitas opções de tecnologias estabelecidas quanto ao emprego desses micro-organismos no manejo agrônomico

das culturas no campo (CLEMENTE et al., 2016; GHALAB et al., 2016). Isso se deve, principalmente, à falta de reprodutibilidade dos resultados obtidos no laboratório em campo, uma vez que o micro-organismo, para ser capaz de auxiliar a planta, deve ser competente, isto é, precisa sobreviver no agroecossistema, extremamente biodiverso, e com condições ambientais variadas (temperatura, umidade, concentrações de nutrientes, pH, concentração de gases, etc) (SANTOYO et al., 2016).

MPCV podem ser encontrados naturalmente na rizosfera das plantas, e apresentam a habilidade de produzir compostos capazes de estimular o desenvolvimento vegetal por meio de diferentes mecanismos, como a produção de hormônios vegetais, sideróforos, através do controle biológico de fitopatógenos e indução de resistência vegetal, além da solubilização de fosfatos e disponibilização de minerais no solo, promovendo uma melhor nutrição para as plantas (SHERATIA et al., 2016).

O grupo das Auxinas, através do seu principal representante, o ácido indolacético (AIA), é uma classe de fitormônios produzido pelos MPCV e conhecida por estimular o crescimento vegetal (CLELAND, 1990). Diversos micro-organismos, incluindo bactérias (KHALID et al., 2004), fungos filamentosos (FLOCH et al., 2003) e leveduras (EL-TARABILY, 2004) são capazes de produzir quantidades significativas de AIA e promover efeitos importantes no crescimento e desenvolvimento vegetal.

Leveduras são fungos unicelulares que podem ser encontrados na rizosfera das plantas, porém em número inferior às bactérias e fungos filamentosos; devido a este fato, pouco é conhecido sobre sua função neste ecossistema, sendo poucos os trabalhos encontrados na literatura sobre o assunto. Rosa (2009) isolou da rizosfera da cana-de-açúcar uma linhagem da espécie *Torulaspota globosa*, e avaliou seu potencial no controle biológico de fitopatógenos, observando resultados favoráveis contra fungos causadores de antracnose (*Colletotrichum sublineolum*) em milho e sorgo (ROSA et al., 2010). Durante a caracterização da espécie, testes apontaram esta levedura como capaz de produzir compostos de estímulo ao crescimento vegetal, como ácido indolacético (ROSA, 2009) e ácidos orgânicos capazes de solubilizar minerais potássicos (ROSA-MAGRI et al., 2012) e fosfato de cálcio (DILARRI et al., 2012).

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma das hortaliças de maior importância, sendo a folhosa mais consumida em todo o mundo. Existem diversas cultivares comerciais, sendo classificadas de acordo com o tipo da folha. As mais comercializadas no Brasil são, respectivamente, crespa, americana, lisa e mimosa. O mercado brasileiro possui preferência pela alface crespa, e, considerando isso, existem diversos projetos de melhoramento genético e desenvolvimento de cultivares (cv) que sejam adaptadas ao nosso clima. Dessa forma, a cv “Crocantela”, desenvolvida na UFSCar, possui essas características, além de resistência a diversas doenças e ciclo curto (SALA e COSTA, 2012; UFSCar, 2013).

Os MPCV podem colaborar com os sistemas agrícolas, e existem diversos trabalhos demonstrando a possibilidade de melhorar características fisiológicas e nutricionais, promovendo crescimento e controlando fitopatógenos (CORRÊA et al., 2010; DURÁN et al., 2016; CHEN et al., 2016). Considerando a importância da horticultura na agricultura brasileira, e a necessidade por tornar a agricultura menos dependente de produtos tóxicos, além dos escassos trabalhos na literatura sobre leveduras rizosféricas, questões são levantadas quanto à presença e ação deste grupo quando associado às plantas, e as condições que afetam sua ação na promoção de crescimento vegetal.

OBJETIVOS

1. Objetivo geral

O objetivo do trabalho foi avaliar a germinação, desenvolvimento inicial das plântulas, mudas e plantas adultas de alface inoculados com a levedura rizosférica *Torulaspóra globosa*.

2. Objetivos específicos

- Inocular sementes e mudas de alface com a levedura *T. globosa* e avaliar sua ação na promoção de crescimento de mudas e na produção de alface (cv Crocantela);

- Avaliar a ação da levedura *T. globosa* na germinação e desenvolvimento inicial de duas cultivares de alface em condições controladas.

REVISÃO DA LITERATURA

1. Alface (*Lactuca sativa* L.)

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma planta pertencente à família Asteraceae, do grupo das olerícolas. Tem grande importância na alimentação humana, destacando-se como fonte de vitaminas B1 e B2, vitaminas C, cálcio e ferro (FERNANDES et al., 2002). É a mais conhecida dentre as hortaliças folhosas, sendo, por isso, cultivada em quase todas as regiões do planeta (ZIECH et al., 2014). Além de seu valor nutritivo, a alface se destaca por ser uma olerícola de fácil aquisição e de baixo custo ao consumidor (OLIVEIRA et al., 2004).

A espécie é originária de clima temperado, cuja adaptação a locais de temperatura e luminosidade elevadas tem dificultado a expressão de todo seu potencial genético, causando limitações em seu crescimento (SETÚBAL; SILVA, 1992). A alface produzida atualmente originou-se de espécies silvestres, ainda encontradas em regiões do sul da Europa e na Ásia Ocidental (FILGUEIRA, 2003). Seu cultivo e comercialização apresenta limitações, devido sua sensibilidade às condições adversas de temperatura, umidade e chuva (GOMES et al., 2005), e devido à sua perecibilidade e baixa resistência ao transporte no pós-colheita. Estas características obrigam que seu cultivo seja realizado próximo aos grandes centros

consumidores, obrigando os produtores a obter o máximo de aproveitamento da produtividade (VIDIGAL et al., 1995).

O mercado de alface no Brasil é conduzido principalmente por pequenos produtores, que conduzem a produção a entrepostos de venda, como CEASA, distribuídos localmente. Através dos distribuidores é feita a principal venda ao consumidor, e onde são levantados os principais dados de cada cultura no setor hortifrúti. De acordo com o boletim Hortigranjeiro (CONAB, 2018), a alface foi comercializada no mês de junho de 2018 pelo valor de R\$ 2,19 o quilo no estado de São Paulo, e a quantidade comercializada no CEAGESP foi de, aproximadamente, 4 toneladas em maio de 2018, sendo o estado de São Paulo o principal produtor de alface do país.

A alface é uma planta herbácea, com caule diminuto, ao qual se prendem as folhas. Estas são amplas e crescem em roseta, em volta do caule. As folhas podem ser lisas ou crespas, formando ou não uma cabeça. Sua coloração pode apresentar vários tons de verde, ou roxo, conforme a cultivar. O sistema radicular é bem ramificado, porém é também superficial, com exploração de apenas os primeiros 0,25 m do solo, quando a planta é oriunda de mudas transplantadas. Quando originadas de semeadura direta, a raiz pivotante pode atingir até 0,60 m de profundidade do solo (FILGUEIRA, 2003).

A coloração das folhas tem um espectro variado de cores desde diversos tons de verde até o roxo. As alfaces comercializadas no Brasil podem ser classificadas em seis grupos de acordo com o tipo de folha (FILGUEIRA, 2003): alface repolhuda-manteiga; alface repolhuda-crespa (americana); solta lisa; solta crespa; mimosa e romana. A alface preferida e mais consumida no Brasil é a alface crespa, representando cerca de 60% do mercado. Por não formarem cabeça e pelas suas folhas crespas, o manuseio e o transporte desta cultivar são facilitados. O ciclo de produção da alface é curto (45 a 60 dias) o que permite que sua produção seja realizada durante o ano inteiro, e com rápido retorno de capital.

O solo ideal para o cultivo dessa hortaliça é o de textura média, rico em matéria orgânica e com boa disponibilidade de nutrientes. Para se obter maior produtividade, é necessário o uso de insumos que melhorem as condições físicas, químicas e biológicas do solo. As maiores produções podem ser obtidas a partir da melhoria das características químicas e físico-química do solo, o que poder ser obtida com o acréscimo de doses crescentes de compostos orgânicos (SOUZA et al., 2005).

A grande suscetibilidade da alface às doenças torna-se um fator de limitação na produção dessa hortaliça. Segundo Filgueira (2003), são conhecidos aproximadamente 75 diferentes tipos de doenças, devendo ser evitado, o quanto possível, o uso de produtos tóxicos no controle fitossanitário, pois estes podem deixar resíduos ao consumidor. Por tratar-se de uma hortaliça de inverno, o seu cultivo em outras épocas do ano, pode favorecer, em algumas regiões, a incidência de doenças e desequilíbrios nutricionais, principalmente, se as condições climáticas se caracterizarem por elevados índices pluviométricos e altas temperaturas (YURI et al., 2004). Por isso, a época de plantio mais recomendada é o final da estação chuvosa, sendo que nas regiões mais frias o cultivo pode ser realizado durante todo o ano, principalmente sob condição de cultivo protegido.

2. Micro-organismos promotores de crescimento vegetal (MPCV)

Os micro-organismos promotores de crescimento vegetal (MPCV) se encontram especialmente na rizosfera das plantas, atraídos pelos exsudatos radiculares (ODOH, 2017), podendo ser encontrados também no interior dos tecidos e na superfície dos vegetais. As estratégias, utilizadas por este grupo microbiano para promover o crescimento das plantas, podem ser diretas ou indiretas; dentre os mecanismos diretos podemos destacar a produção de hormônios vegetais, como as auxinas (SUAREZ et al., 2014); indiretamente os micro-organismos podem auxiliar a nutrição das plantas, disponibilizando minerais insolúveis (SINGH et al., 2011), transformando nutrientes em formas assimiláveis, como o nitrogênio pelas diazotróficas (GOPALAKRISHNAN et al., 2017) ou tornando sua absorção mais eficiente, como os fungos micorrízicos (SYMANCZIK et al., 2017). O controle de micro-organismos fitopatogênicos ou deletérios também é uma estratégia que possibilita o melhor desenvolvimento das plantas (PEREG; MCMILLAN, 2014).

A produção de hormônios vegetais pode regular o crescimento, além de diversos aspectos da fisiologia vegetal, como senescência e dominância apical (ODOH, 2017). Dessa forma, os micro-organismos produtores de hormônios vegetais contribuem com o crescimento de plantas, ajudando na resposta a fatores ambientais, bióticos e abióticos (DODD et al., 2010); apesar de as plantas produzirem os próprios hormônios, a quantidade produzida não supre a demanda interna, necessária para seu desenvolvimento (ODOH, 2017). Dentre os hormônios

vegetais mais ligados ao incremento vegetal está o grupo das auxinas, sendo seu principal representante o ácido indolacético (AIA), responsável pela regulação da divisão celular, expansão e diferenciação celular, e polarização, além de desenvolvimento de órgãos, como raiz lateral e adventícia e dominância apical (LUDWIG-MÜLLER, 2014). A maioria dos micro-organismos que produzem AIA, utilizam como precursor o aminoácido triptofano; dentre os micro-organismos relatados como produtores de AIA através de triptofano podemos citar as bactérias *Bacillus amyloliquefaciens*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, entre outras (LIU et al., 2016; SHAO et al., 2015), assim como as leveduras do gênero *Williopsis* e *Torulaspota* (FU et al., 2016; NASSAR et al., 2005) e o fungo filamentosso *Trichoderma asperellum* (Li et al., 2017).

O uso de MPCV como biofertilizantes em culturas de importância econômica tem sido bastante considerado. A biofertilização é o mecanismo através da qual o micro-organismos suprem e/ou disponibilizam nutrientes básicos à planta, de forma a promover uma melhor nutrição, e conseqüentemente melhor desenvolvimento do vegetal (ODOH, 2017). A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é uma das formas de disponibilização de nutrientes, sendo utilizada como prática da agricultura (GELFAND e ROBERTSON, 2015). Assim como o nitrogênio, o fósforo é um elemento essencial para o desenvolvimento das plantas, e quando aplicado na sua forma solúvel, é perdido por se ligar fortemente às partículas de solo, tornando-se em grande parte, insolúvel e indisponível às plantas (ODOH, 2017). Dessa forma, a ação de micro-organismos solubilizadores de fosfatos se dá pela disponibilização desse mineral na sua forma solúvel, na solução do solo (SHARMA et al., 2011). A mineralização de fosfatos orgânicos, ou a mobilização da forma orgânica para inorgânica também é um mecanismo microbiano, que torna possível a absorção do nutriente pela planta (SINGH et al., 2011). Existem diversos gêneros capazes de solubilizar fosfatos, dentre os quais há exemplos de bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia* (SHAO et al., 2015), leveduras dos gêneros *Candida*, *Clavispora*, *Torulaspota* e *Rhodospordium* (FU et al., 2016; SARABIA et al., 2018) e fungos filamentosos dos gêneros *Curvularia* e *Penicillium* (PRIYADHARSINI; MUTHUKUMAR, 2017; SINGH; REDDY, 2011).

Outra estratégia utilizada pelos MPCV é o controle biológico de fitopatógenos e deletérios. Dentre os mecanismos utilizados para o controle biológico, a produção de antibióticos consiste em uma forma direta de controle, sendo que bactérias dos

gêneros *Bacillus*, *Streptomyces* e *Pseudomonas* (POSTMA et al., 2009; SHAO et al., 2015; YUAN et al., 2015) são descritos como produtores. As leveduras *killer* são conhecidas pela produção de micotoxinas que matam outros micro-organismos, dentre eles, fitopatógenos, o que as tornam candidatas a agentes de controle biológico (ALLOUI et al., 2015; LIMA et al., 2013). Produção de enzimas hidrolíticas (CATTELAN et al., 1999; PALUMBO et al., 2005), compostos voláteis (HERNÁNDEZ-LEÓN et al., 2015) também podem ser produzidos e utilizados pelos MPCV no controle de patógenos e deletérios, tanto por bactérias, como fungos (ODOH, 2017). Outro mecanismo de controle bastante utilizado é a competição por nicho e nutrientes (ODOH, 2017); MPCV capazes de colonizar rapidamente a rizosfera ou filosfera são hábeis em utilizar os nutrientes disponíveis e se desenvolver no espaço disponível, não possibilitando, aos patógenos, chance de estabelecimento e impedindo o desenvolvimento da doença (PAHARI; MISHRA, 2017).

O emprego de MPCV apresenta-se, desta forma, como uma tecnologia com grande potencial que necessita ser explorada e desenvolvida; o uso de defensivos agrícolas de forma intensa tem mostrado ser prejudicial em médio e longo prazo para a sustentabilidade dos agroecossistemas. Os MPCV podem ser utilizados para a diminuição e, até mesmo a substituição de compostos químicos que apresentam toxicidade ao meio ambiente, e parece ser um dos caminhos para o desenvolvimento de manejos agrônômicos mais sustentáveis e ecológicos.

3. Leveduras promotoras de crescimento vegetal

Leveduras são fungos unicelulares, que habitam diversos ambientes, dentre eles a superfície das plantas e o solo (BOTHIA, 2011); espécies isoladas de rizosfera são descritas na literatura como capazes de promover crescimento vegetal das plantas (AL-FALIH, 2005). Devido sua baixa concentração no solo, em relação a outros grupos microbianos (bactérias e fungos filamentosos), são, em geral, menos estudadas (MOHAMED; METWALLY, 2014). Dentre as espécies de leveduras avaliadas como promotoras de crescimento vegetal *Candida* sp. isolada de amostra de solo, apresentou capacidade de solubilização de fosfatos, produção de AIA, sideróforos, exopolissacarídeos, sendo capaz de resistir à seca e promover o

crescimento de Feijão Rajado (*Vigna radiata*) sob estresse hídrico (SILAMBARASAN; VANGNAI, 2017).

As leveduras das espécies *Cryptococcus flavus*, *Rhodospiridium paludigenum*, *Hannaella sinensis* e *Torulaspota globosa*, isoladas de rizosfera de arroz e cana-de-açúcar, apresentaram capacidade de produção de AIA, além de atividade de catalase (NUTARATAT et al., 2014). *Rh. paludigenum* mostrou-se hábil em produzir sideróforos, e *C. flavus* foi capaz de produzir AIA e apresentar atividade de carboximetil celulase. *T. globosa* apresentou antagonismo com patógenos fúngicos através da produção de compostos voláteis (NUTARATAT et al., 2014).

Isolando leveduras de *Drosera spatulata*, Fu et al. (2016), observaram a produção de AIA por diversos gêneros de leveduras, como *Aureobasidium*, *Candida*, *Dothideomycetes*, *Hanseniaspora*, *Saccharomyces* e *Torulaspota*. Dentre as solubilizadoras de fosfato e óxido de zinco, diversos gêneros apresentaram atividade solubilizadora, porém, apenas *Saccharomyces* e *Torulaspota* apresentaram capacidade de solubilizar fosfato bicálcico e fosfato tricálcico; o gênero que apresentou maior capacidade de solubilizar óxido de zinco foi *Dothidemomycetes*. Em relação à produção de sideróforos, o gênero com maior produção foi *Pseudozyma*. Nos testes de atividade antifúngica contra o fungo *Glomerella cingulata*, as leveduras com maior atividade foram *Barnettozyma* e *Galactomyces* (FU et al., 2016).

Como uma característica de um MPCV, a levedura *Metschnikowia* sp. foi selecionada como um possível agente de controle biológico contra *Penicillium digitatum*, agente causador do bolor verde em citrus, mostrando total inibição até 7 dias após inoculação (LIU et al., 2017). Uma das vantagens de se utilizar uma levedura no controle biológico pós-colheita é a maior capacidade desse grupo em resistir à baixa atividade de água, se comparado a outros grupos microbianos (LIU et al., 2017).

4. Uso de micro-organismos promotores de crescimento vegetal em espécies olerícolas

Estudos apontam a ação de micro-organismos na promoção de crescimento de diversas espécies olerícolas, sendo a alface uma das culturas estudadas. Chabot et al. (1996) inocularam sementes de alface através da imersão em suspensão de

Rhizobium leguminosarum, levando as plantas à campo, e observaram um aumento significativo da massa seca das plantas, principalmente em área com solo com baixa fertilidade. *Azospirillum brasilense* foi aplicada em sementes de alface e observou-se aumento da biomassa vegetal, melhora da qualidade da hortaliça sob estresse salino, além de aumento da quantidade de ácido ascórbico e diminuição da oxidação das plantas (FASCIGLIONE et al., 2015).

A resistência a estresse tem sido observada como uma das vantagens oferecidas pela inoculação das plantas com MPCV; a inoculação de mudas de alface com a bactéria *Pseudomonas mendocina*, através de aplicação via *drench* em casa de vegetação, promoveu o aumento de biomassa vegetal, em condição de alta salinidade (RUZZI e AROCA. 2015).

Além da alface, outras hortaliças de grande importância são estudadas com o uso de MPCV, como é o caso da batata. Cerca de 40% da produção mundial é baixa por conta da baixa eficiência de absorção de fósforo pela raiz da batata (ZAIDI et al., 2015), dessa forma, a utilização de micro-organismos solubilizadores de fosfatos são uma boa opção para melhorar produtividade. Malboobi et al. (2009) testaram três diferentes bactérias solubilizadoras de fósforo em associação, *Pantoea agglomerans*, *Microbacterium laevaniformans* e *Pseudomonas putida*, e a aplicação resultou em aumento de biomassa tanto em casa de vegetação como em campo. As bactérias *Bacillus cereus* e *Achromobacter xylosoxidans*, solubilizadoras de fósforo e produtoras de AIA, também promoveram crescimento vegetal ao serem aplicadas em batata (DAWWAN et al., 2013).

O tomate é uma hortaliça de grande importância mundial, com produção de 129 toneladas em 2008 (ZAIDI et al., 2015), e também pode ser favorecida pelo uso de micro-organismos promotores de crescimento vegetal. Bernabeu et al. (2015) verificaram que a aplicação da bactéria *Burkholderia tropica* em plantas de tomate promoveram um aumento no número e no peso de frutos de tomate, além de verificar a capacidade de colonização da planta pelo micro-organismo. As bactérias solubilizadoras de fósforo *Pantoea agglomerans* e *Burkholderia anthina* também promoveram crescimento vegetal em tomate, tanto aplicadas separadamente, como em co-inoculação, promovendo maior absorção de fósforo pela planta e aumentando peso seco de parte aérea e raiz (WALPOLA; YOON, 2013).

Existem evidências de promoção de crescimento vegetal em outras hortaliças, como *Bacillus cereus*, *Brevebacillus reuszeri*, *Rhizobium rubi* em brócolis, *Bacillus*

megaterium, *P. agglomerans*, *Bacillus subtilis* em repolho, *B. cereus*, *Bacillus licheniformis*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *Bacillus strains*, *Pseudomonas putida*, *Paenibacillus polymyxa* em espinafre, entre outros casos (ZAIDI et al., 2015).

LITERATURA CITADA

ALBERTINI, J. **Produção de ácido indolacético *in vitro* por *Torulaspota globosa***. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados, Universidade Federal de São Carlos, 2016.

AL-FALIH, A.M. Phosphate solubilization *in vitro* by some soil yeasts. **Qatar University Science**, v. 25 p.119-125, 2005.

ALAGUKANNAN, G; ASHOKKUMAR, M. Role of effective microorganisms (EM) in sustainable agriculture – A review and recommendations. **International Journal of Scientific Research**, v. 4, n. 9, 2015.

ALOUI, H.; LICCIARDELLO, F.; KHWALDIA, K.; HAMDI, M.; RESTUCCIA, C. Physical properties and antifungal activity of bioactive films containing *Wickerhamomyces anomalus* killer yeast and their application for preservation of oranges and control of postharvest green mold caused by *Penicillium digitatum*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 200, p. 22-30, 2015.

AROCA, R.; VERNIERI, P.; RUIZ-LOZANO, J.M. Mycorrhizal and non-mycorrhizal *Lactuca sativa* plants exhibit contrasting responses to exogenous ABA during drought stress and recovery. **Journal of Experimental Botany**. v. 59, p. 2029-2041, 2008.

BALDRIAN, P. Editorial: Special thematic issue on the ecology of soil microorganisms. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 93. n. 2, 2016.

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

CASSÁN, F.; DIAZ-ZORITA, M.D. *Azospirillum* sp. in current agriculture: From the laboratory to the field. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 103, p.117-130, 2016.

CATTELAN, A.J.; HARTEL, P.G.; FUHRMANN, J.J. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. **Soil Science Society of America Journal**, v. 63, n. 6, p. 1670-1680, 1999.

CHABOT, R.; ANTOUN. H.; CESCAS. M.P. Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rizobium leguminosarum* biovar. *phaseoli*. **Plant and Soil**. v. 184, p. 311-321, 1996.

CHEN, X.; PIZZATTI, C.; BONALDI, M.; SARACCHI, M.; ERLACHER, A.; KUNOVA, A.; BERG, G.; CORTESI. P. Biological control of lettuce drop and host plant colonization by rhizospheric and endophytic streptomycetes. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.

CLELAND, R.E. **Auxin and cell elongation**. In: DAVIES. P.J. (ed) Plant hormones and their role in plant growth and development. Kluwer. Dordrecht. p. 132-148. 1990.

CLEMENTE, J.M.; CARDOSO, C.R.; VIEIRA, B.S.; FLO, I.M.; COSTA, R.L. Use of *Bacillus* spp. as growth promoter in carrot crop. **African Journal of Agricultural Research**. v. 11, n. 35, 2016.

CONAB, **Boletim Hortigranjeiro**, v. 4, n. 6, 2018.

CORRÊA, E.B.; BETTIOL, W.; SUTTON, J.C. Controle biológico da podridão radicular (*Pytium aphanidermatum*) e promoção de crescimento por *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 e *Bacillus subtilis* GB03 em alface hidropônica. **Summa Phytopatologica**. v. 36, n. 4, p.275-281, 2010.

DAWWAN, G.E.; ELBELTAGY, A.; EMARA, H.M.; ABBAS, I.H.; HASSAN, M.M. Beneficial effect of plant growth promoting bacteria isolated from the roots of potato plant. **Annals of Agricultural Science**, v. 58, n. 2, p. 195-201, 2013.

DE-MORAIS, T.P.; DE BRITO, C.H.; BRANDÃO, A.M.; REZENDE, W.S. Inoculation of maize with *Azospirillum brasilense* in the seed furrow. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, p. 290-298, 2016.

DILARRI, G.; BIZARRIA JUNIOR, R.; SCARCELLA, A.S.A.; SANTANA, R.I.M.; ROSA-MAGRI, M.M. Avaliação de leveduras isoladas de áreas agrícolas como solubilizadoras de rochas e minerais. In: **VII Congresso Científico da Uniararas**. 2012. Araras. Anais do VII Congresso Científico da Uniararas. 2012.

DODD, I.C.; ZINOVKINA, N.Y.; SAFRONOVA, V.I.; BELIMOV, A.A. Rhizobacterial mediation of plant hormone status. **Annals of Applied Biology**, v. 157, p. 361-379, 2010.

DURÁN, P.; ACUÑA, J.J.; ARMADA, E.; LÓPEZ-CASTILLO, O.M.; CORNEJO, P.; MORA, M.L.; AZCÓN, R. Inoculation with seleno bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi to enhance selenium content in lettuce plants and improve tolerance against drought stress. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**. v. 16, n. 1, p. 201-225, 2016.

EL-TARABILY, K.A. Supression of *Rhizoctonia solani* diseases of sugar beet by antagonistic and plant growth-promoting yeasts. **Journal of Applied Microbiology**, v.96, p.69-75, 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.

FERNANDES, A.A; MARTINEZ, H.E.P.; PEREIRA, P.R.G.; FONSECA, M.C.M. Produtividade, acúmulo de nitrato e estado nutricional de cultivares de alface em

hidroponia, em função de fontes de nutrientes. **Horticultura Brasileira**, v. 20, n. 2, p. 195-200, 2002.

FASCIGLIONE, G.; CASANOVAS, E.M.; QUILLEHAUQUY, V.; YOMMI, A.K.; GOÑI, M.G.; ROURA, S.I.; BARASSI, C.A. *Azospirillum* inoculation effects on growth, product quality and storage life of lettuce plants grown under salt stress. **Scientia Horticulturae**, v. 195, p 154-162, 2015.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 2 ed. Viçosa: UFV, 2003.

FLOCH, G.; REY, P.; BENIZRI, E.; BENHAMOU, N.; TIRILLY, Y. Impact of auxin compounds produced by the antagonistic fungus *Pythium oligandrum* or the minor pathogen *Pythium* group F on plant growth. **Plant Soil**, v. 257, p. 459-470, 2003.

FONTANA, L. **Avaliação física, físico-química e sensorial de cultivares alface produzidas em diferentes sistemas de cultivo**. Tese de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Agroecologia e Desenvolvimento Rural. Universidade Federal de São Carlos, 68 p., 2016.

FU, S.F.; SUN, P.F.; LU, H.Y.; WEI, J.Y.; XIAO, H.S.; FANG, W.T.; CHEN, B.Y.; CHOU, J.Y. Plant growth-promoting traits of yeasts isolated from the phyllosphere and rhizosphere of *Drosera spatulata* Lab. **Fungal Biology**, v. 120, p. 433-448, 2016.

GALAB, N.M.; TANTAWY, E.A.; KHALIL, H.M.A.; SHABAN, K.A. Excreting from bacteria and cyanobacteria as essential factors for alleviation soil salt stress on rice plant. **Journal of Microbiology Research**, v. 6, 2016.

GELFAND, I.; ROBERTSON, G.P. A reassessment of the contribution of soybean biological nitrogen fixation to reactive N in the environment. **Biochemistry**, v. 123, p. 175-184, 2015.

GILARDI, G.; DEMARCHI, S.; GULLINO, M.L.; GARIBALDI, A. Evaluation of the short-term effect of nursery treatments with phosphite-based products acibenzolar-S-methyl pelleted *Brassica carinata* and biocontrol agents against lettuce and cultivated rocket fusarium wilt under artificial inoculation and greenhouse conditions. **Crop Protection**, v. 85, p. 23-32, 2016.

GOMES, T.M.; BOTREL, T.A.; MODOLO, V.A.; OLIVEIRA, R.F. Aplicação de CO₂ via água de irrigação na cultura da alface. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 2, p. 316-319, 2005.

GOPALAKRISHNAN, S.; SRINIVAS, V.; SAMINENI, S. Nitrogen fixation, plant growth and yield enhancements by diazotrophic growth-promoting bacteria in two cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, p. 116-123, 2017.

HERNÁNDEZ-LEÓN, R.; ROJAS-SOLÍS, D.; CONTRERAS-PÉREZ, M. OROZCO-MOSQUEDA, M.D.C.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L.I.; REYES-DE LA CRUZ, H.; VALENCIA-CANTERO, E.; SANTOYO, G. Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. **Biological Control**, v. 81, p. 83-92, 2015.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M.A.; ARAUJO, R.S. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. **Biology and Fertility of Soils**, v. 49, p. 791-801, 2013.

KAHMEN, A.; BOLLER, T.; MÄDER, P. Application of mycorrhiza and soil from a permaculture system improved phosphorus acquisition in naranjilla. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, art. 1263, 2017.

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

LAMICHHANE, J.R.; DACHBRODT-SAAAYDEH S.; KUDSK P.; MESSÉANM A. Toward a reduced reliance on conventional pesticides in European agriculture. **Plant Disease**. v. 100, n. 1, p. 10-24, 2016.

LI, Y.; HWANG, S.; HUANG, Y. HUANG, C. Effects of *Trichoderma asperellum* on nutrient uptake and *Fusarium* wilt of tomato. **Crop Protection**, v. 110, p. 275-282, 2018.

LIMA, J.R.; GONDIM, D.M.F.; OLIVEIRA, J.T.A.; OLIVEIRA, F.S.A.; GONÇALVES, L.R.B.; VIANA, F.M.P. Use of killer yeast in the management of postharvest papaya anthracnose. **Postharvest Biology and Technology**, v. 83, p. 58-64, 2013.

LIU. Y.; CHEN. L.; ZHANG. N.; LI. Z.; ZHANG. G.; XU. Y.; SHEN. Q.; ZHANG. R. Plant-microbe communication enhances auxin biosynthesis by a root-associated bacterium. *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v.29. p.324-330. 2016.

LIU, Y.; WANG, W.; ZHOU, Y.; YAO, S.; DENG, L.; ZENG, K. 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.

LUDWIG-MÜLLER, J. Bacteria and fungi controlling plant growth by manipulating auxin: balance between development and defense. **Journal of Plant Physiology**, v. 172, p. 4-12, 2015.

MALBOOBI, M.A.; BEHBAHANI, M.; MADANI, H.; OWLIA, P.; DELJOU, A.; YAKHCHALI, B.; MORADI, M.; HASSANABADI, H. Performance evaluation of potent phosphate solubilizing bacteria in potato rhizosphere. **Word Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 8, p. 1479-1484, 2009.

MOHAMED, H.M.; METWALLY, A.K. Effect of combined inoculation of *Rhizobium* with soil yeasts on nodulation. growth and yield of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under field condition. **American Journal of Plant Nutrition and Fertilization Technology**, v. 4, p. 1-10, 2014.

MYLONA, P.; PAWLOWSKI, K.; BISSELING, T. Symbiotic nitrogen fixation. **The Plant Cell**. v. 7, p. 869-885, 1995.

NASSAR, A.; EL-TARALIBY, K.; 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.

NUTARATAT, P.; SRISUK, N.; ARUNRATTIYAKORN, P.; LIMTONG, S. Plant growth-promoting traits of epiphytic and endophytic yeast isolated from rice and sugar cane leaves in Thailand. **Fungal Biology**, v. 118, p. 683-694, 2014.

NUROLITA, Y.; ADETUTUA, E.M.; GUNAWANB, H.; ZULB, D.; BALLA, A.S. Restoration of tropical peat soils: the application of soil microbiology for monitoring the success of the restoration process. **Agriculture, Ecosystems and Environment**. v. 216, p. 293-303, 2016.

ODOH, C.K. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a bioprotectant bioinoculant for sustainable agrobiolgy. A review. **International Journal of Advanced Research in Biological Sciences**. v. 4, p. 123-142, 2017.

OLIVEIRA, A.K.M.; PEREIRA, K.C.L.; MULLER, J.A.I.; MATIAS, R. Análise fitoquímica e potencial alelopático das cascas de *Pouteria ramiflora* na germinação de alface. **Horticultura Brasileira**, v. 32, n. 1, p. 41-47, 2014.

PAHARI, A.; MISHRA, B.B. Antibiosis of siderophore producing bacterial isolates against phytopathogens and their effect on growth of okra. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**. v. 6. p. 1925-1929. 2017.

PALUMBO, J.D.; YEN, G.Y.; JOCHUM, C.C.; TATUM, K. KOBAYASHI, Y. Mutagenesis of β -1,3-Glucanase genes in *Lysobacter enzymogenes* strain C3 results in reduced biological control activity toward bipolares leaf spot of tal fescue and Pythium damping-off of sugar beet. **Biological Control**, v. 95, n. 6, 2005.

PAWAR, S.T.; BHOSALE, A.A.; GAWADE, T.B.; NALE, T.R. Isolation, screening and optimization of exopolysaccharide producing bacterium from saline soil. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v. 3, p. 24-31, 2013.

PEREG, L.; MCMILLAN, M.; Scoping de potential uses of beneficial microorganisms for increasing productivity in cotton cropping systems. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 80, p. 349-358, 2015.

POSTMA, J.; STEVENS, L.H.; WIEGERS, W.D.; NIJHUIS, E.H. Biological control of *Pythium aphanidermatm* in cucumber with a combined application of *Lysobacter enzymogenes* strain 3.1T8 and chitosan. **Biological Control**, v. 48, p. 301-309, 2009.

PRIYADHARSINI, P.; MUTHUKUMAR, T. The root endophytic fungus *Curvularia geniculata* from *Parthenium hysterophorus* roots improves plant growth through phosphate solubilization and phytohormone production. **Fungal Ecology**, v. 27, p. 69-77, 2017.

ROSA, M.M. Avaliação de leveduras isoladas de áreas agrícolas como agentes no controle biológico de fitopatógenos. 121f. **Tese (Doutorado)** – Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro. Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, 2009.

ROSA, M.M. TAUKE-TORNISIELO, S.M.; RAMPAZZO, P.E.; CECCATO-ANTONINI, S.R. Evaluation of the biological control by yeast *Torulaspota globosa* against *Colletotrichum sublineolum* in sorghum. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 1491-1502, 2010.

ROSA-MAGRI, M.M.; AVANSINI, S.H.; LOPES-ASSAD, M.L.; TAUKE-TORNISIELO, S.M.; CECCATO-ANTONINI, S.R. Release of potassium from rock powder by the yeast *Torulaspota globosa*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, 2012.

ROUPHAEL, Y.; FRANKEN, P.; SCHNEIDER, C.; SCHWARZ, D.; GIOVANETTI, M.; AGNOLUCCI, M.; DE PASCALE, S.; BONINI, P.; COLLA, G. Arbuscular mycorrhizal

fungi act as biostimulants in horticultural crops. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 91-108, 2015.

RUZZI, M.; AROCA, R. Plant growth-promoting rhizobacteria act as biostimulants in horticulture. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 124-134, 2015.

SALA, F.C.; COSTA, C.P. Retrospectiva e tendência da alfacicultura brasileira. **Horticultura Brasileira**, v. 30, p. 187-194, 2012.

SANTOYO, G.; MORENO-HAGELSIEB, G.; OROZCO-MOSQUEDA, M.C.; GLICK, B.R. Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiological Research**, v. 183, 2016.

SARABIA, M.; CAZARES, S.; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, A.; MORA, F.; CARREÓN-ABUD, Y.; LARSEN, J. Plant growth promotion traits of rhizosphere yeasts and their response to soil characteristics and crop cycle in maize agroecosystems. **Rhizosphere**, v. 6, p. 67-73, 2018.

SCARCELLA, A.S.A; BIZARRIA JUNIOR; R. BASTOS, R.G.; ROSA-MAGRI, M.M. Temperature, pH and carbon source affect drastically indole acetic acid production of plant growth promoting yeasts. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 34, n. 2, p. 441- 450, 2017.

SETUBAL, W.J.; SILVA, A.R. Avaliação do comportamento de alface de verão em condições de calor no município de Teresina-PI. **UFPI**, 17p, 1992.

SHAO, J.; XU, Z.; ZHANG, N.; SHEN, Q.; ZHANG, R. Contribution of índole-3-acetic acid in the plant growth promotion by the rhizospheric strain *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. **Bioly and Fertility of Soils**. v. 51, p. 321-330, 2015.

SHARMA, S.; KUMAR, V; TRIPATHI, R.B. Isolation of phosphate solubilizing microorganisms (PSMs) from soil. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v. 1, p. 90-95, 2011.

SHERATHIA, D.; DEY, R.; THOMAS, M.; DALSANIA, T.; SAVSANI, K.; PAL, K.K. Biochemical and molecular characterization of DAPG-producing plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). **Legume Research**, v. 39, n. 4, 2016.

SIMONS, M.; VAN DER BIJ, A.J.; BRAND, I.; DE WEGER, L.A.; WIJFFELMAN, C.A.; LUGTENBERG, B.J.J. Gnotobiotic system for studying rhizosphere colonization by plant growth-promoting *Pseudomonas* bacteria. **Phytopathological Society**, v. 9, p. 600-607, 1996.

SINGH, H.; REDDY, M.S. Effect of inoculation with phosphate solubilizing fungus on growth and nutrient uptake of wheat and maize plants fertilized with rock phosphate in alkaline soils. **European Journal of Soil Biology**, v. 47, p. 30-34, 2011.

SINGH, J.S.; PANDEY, V.C.; SINGH, D.P. Efficient soil microorganisms: a new dimension for sustainable agriculture and environmental development. **Agriculture. Ecosystems and Environment**, v. 140, p. 339-353, 2011.

SILAMBARASAN, S.; VANGNAI, A.S. Plant-growth promoting *Candida* sp. AVGB4 with capability of 4-nitroaniline biodegradation under drought stress. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 139, p. 472-480, 2017.

SOUZA, P.A.; NEGREIROS, M.Z.; MENEZES, J.B.; BEZERRA NETO, F.; SOUZA, G.L.F.M.; CARNEIRO, C.R.; QUEIROGA, R.C.F. Características químicas de alface cultivada sob efeito residual da adubação com composto orgânico. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 3, p. 754-757, 2005.

SUAREZ, D.E.C.; GIGON, A.; PUGA-FREITAS, R.; LAVELLE, P.; VELASQUEZ, E.; BLOUIN, M. Combined effects of earthworms and IAA-producing rhizobacteria on plant growth and development. **Applied Soil Ecology**, v. 80, p.100-107, 2014.

SYMANCZIK, S.; GISLER, M.; THONAR, C.; SCHLAEPPI, K.; VAN DER HEIJDEN, M.; PANKIEVICZ, V. C. S.; DO AMARAL, F. P.; SANTOS, K. F. D. N.; AGTUCA, B.; XU, Y.; SCHUELLER, M. J.; ARISI, A. C. M.; STEFFENS, M.B.R.; DE SOUZA, E. M.;

PEDROSA, F. O.; STACEY, G.; FERRIERI, R. A. Robust biological nitrogen fixation in a model grass–bacterial association. **The Plant Journal**, v. 81, p.907–919, 2015.

THOKCHOM, E.; THAKURIA, D.; KALITA, M.C.; SHARMA, C.K.; TALUKDAR, N.C. Root colonization by host-specific rhizobacteria alters indigenous root endophyte and rhizosphere soil bacterial communities and promotes the growth of mandarin orange. **European Journal of Soil Biology**, v. 79, p. 48-56, 2017.

UFSCar. UFSCar desenvolve nova cultivar de alface. Informativo FAI-UFSCar, n. 133, p.3, 2013.

VIDIGAL, M.V.; RIBEIRO, A.C.; CASALI, V.W.D.; FONTES, L.E.F. Resposta da alface (*Lactuca sativa* L.) ao efeito residual da adubação orgânica. I. Ensaio de campo. **Revista Ceres, Viçosa**, v. 42, n. 239, p. 80-88, 1995.

XUE, A.G.; GUO, W.; CHEN, Y.; SIDDIQUI, I.; MARCHAND, G.; LIU, J.; REN, C. Effect of seed treatment with novel strains of *Trichoderma* spp. on establishment and yield of spring wheat. **Crop Protection**, v. 96, p. 97-102, 2017.

ZAIDI, A.; AHMAD, E.; KHAN, M.S.; SAIF, S.; RIZVI, A. Role of plant growth promoting rhizobacteria in sustainable production of vegetables: current perspective. **Scientia Horticulturae**, v. 193, p. 231-239, 2015.

ZIECH, A.R.D.; CONCEIÇÃO, P.C.; LUCHESE, A.V.; PAULUS, D.; ZIECH, M. Cultivo de alface em diferentes manejos de cobertura do solo e fontes de adubação. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, n. 9, p. 948-954, 2014.

YUAN, J.; ZHANG, N.; HUANG, Q.; RAZA, W.; LI, R.; VIVANCO, J.M.; SHEN, Q. Organic acids from root exudates of banana help root colonization of PGPR strain *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6. **Scientific Reports**, v. 5, 13438, 2015.

YURI, J.E.; RESENDE, G.M.; RODRIGUES JÚNIOR, J.C.; MOTA, J.H.; SOUZA, R.J. Efeito de composto orgânico sobre a produção e características comerciais de alface americana. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 1, p. 127-130, 2004.

CAPÍTULO 1. *Torulaspora globosa*: levedura rizosférica que promove crescimento de alface em condições de produção de muda e pós-transplante em campo

1. Resumo

Este trabalho apresentou como objetivo a avaliação da inoculação da levedura rizosférica *Torulaspora globosa* (linhagem 5S55) no desenvolvimento de alface (cv Crocantela) nas fases de muda e após a colheita da planta adulta. O primeiro experimento consistiu na avaliação da inoculação das sementes e mudas, com avaliação das plantas antes do transplante para o campo. Para tanto, sementes foram inoculadas com células da levedura (1×10^8 células.kg de semente⁻¹). As plântulas (oriundas de sementes inoculadas e não inoculadas) foram divididas em 3 tratamentos, que receberam, ou não, nova inoculação de 1×10^6 células.muda⁻¹, 7 dias após a emergência e/ou 15 dias após a emergência das plantas. Trinta dias após a emergência, as mudas foram avaliadas quanto ao comprimento da parte aérea e raiz, número de folhas, largura da folha e massa seca. O segundo experimento consistiu no transplante das mudas para o campo; após 30 dias de cultivo estas foram colhidas e avaliadas quanto ao comprimento da parte aérea, comprimento do caule, largura, comprimento e número de folhas, massa fresca e seca da parte aérea. Os resultados obtidos mostraram que a inoculação da levedura nas três ocasiões (sementes, 7 e 15 dias após a emergência) proporcionaram plantas com número de folhas reduzido, e com menor comprimento de raiz, apesar de maior massa de raiz (sistema radicular menor e mais ramificado). Apesar de mudas com menos folhas, estas se apresentaram mais largas e compridas, o que se refletiu em uma maior massa da parte aérea. Para as plantas transplantadas, os resultados mostraram que para as variáveis altura, número de folhas, comprimento e largura de folhas, e peso fresco de parte aérea, o tratamento não inoculado apresentou valores estatisticamente inferiores. A inoculação das sementes e mudas com a levedura mostrou ser eficiente na promoção de crescimento de alface. Estudos relacionados à métodos de inoculação, formulações do inóculo, concentração de células, porém, são imperativos para otimizar os resultados de promoção de crescimento e para o estabelecimento da tecnologia.

Palavra-chave: promoção de crescimento vegetal; bioestimulante; mudas de alface; Crocantela

2. Introdução

A necessidade crescente da humanidade por comida faz com que a agricultura busque cada dia mais por alta produtividade, empregando grandes quantidades de insumos químicos para suprir a demanda requerida (LAMICHHANE et al., 2016). Porém, o aumento do uso de fertilizantes ou defensivos agrícolas no solo não são sustentáveis para a agricultura, tanto ambientalmente como financeiramente (ETESAMI e MAHESHWARI, 2018). O solo possui alta biodiversidade, e interações complexas que se relacionam com sua capacidade produtiva, estabilidade estrutural, absorção de água e absorção de nutrientes (SIDIBÉ et al., 2018).

Trazer para a agricultura uma abordagem mais sustentável seria possível através da utilização de micro-organismos promotores de crescimento vegetal (MPCV), e se beneficiando da interação micro-organismo-planta (LUGTENBERG et al., 2002). As comprovações de que os MPCV podem trazer benefícios aos cultivos em ambientes controlados são inúmeras, porém, quando levadas à campo, existem inúmeros fatores que podem influenciar nos resultados, como estresses bióticos, abióticos, a microbiota nativa, a especificidade micro-organismo-planta, o clima, até mesmo a confiança do produtor, entre outros aspectos (TABASSUM et al., 2017). Dessa forma, as opções de tecnologias utilizando MPCV não são bem estabelecidas no manejo agrônomo das culturas no campo (CLEMENTE et al., 2016).

Os MPCV habitam o solo e as plantas, possuem mecanismos para a promoção de crescimento vegetal que variam desde defender as plantas de doenças, aumentar absorção de nutrientes, através de fixação de nitrogênio e solubilização de fosfatos, produção de sideróforos, fitormônios, capacidade de estimular nas raízes e folhas a indução de resistência a estresses bióticos e abióticos, entre outros mecanismos (ODOH, 2017).

Dentre os mecanismos de promoção de crescimento vegetal, a produção de fitormônios, em especial o ácido indolacético (AIA), do grupo das auxinas, é conhecida por promover o crescimento vegetal (LUDWIG-MÜLLER, 2014). Bactérias, leveduras e fungos filamentosos são capazes de produzir quantidades significativas de AIA, e estimular o crescimento vegetal (SARABIA et al., 2018; PRIYADHARSINI e MUTHUKUMAR, 2017; SHAO et al., 2015).

Leveduras estão presentes em diversos ambientes naturais, como solo, rizosfera, folhas, entre outros ambientes, porém, não são tão estudados como as

bactérias e os fungos filamentosos (NASSAR et al., 2005). A levedura *Torulaspora globosa* foi isolada de cana-de-açúcar, e mostrou-se capaz de produzir compostos promotores de crescimento vegetal, como AIA, ácidos orgânicos solubilizadores de fosfatos (OLIVEIRA, 2016; ROSA, 2009; ROSA-MAGRI et al., 2012).

Alface (*Lactuca sativa* L.) é a hortaliça folhosa mais comercializada no Brasil, e uma cultura mais adaptada ao clima ameno (FERNANDES et al., 2002). Dessa forma, existem diversos programas de melhoramento genético para desenvolvimento de cultivares (cv) adaptadas ao nosso clima, como é o caso da cv “Crocantela”, desenvolvida na UFSCar, adaptada ao clima quente, possui folha intermediária entre crespa e americana, resistência a diversas doenças e ciclo curto (SALA e COSTA, 2012; UFSCAR, 2013).

Considerando a importância da horticultura na agricultura, e a capacidade de promoção de crescimento vegetal dos MPCV em hortaliças (FASCIGLIONE et al., 2015; ZAIDI et al., 2015), o objetivo deste trabalho foi a inoculação de sementes e mudas de alface, cv Crocantela, com a levedura rizosférica *Torulaspora globosa* (linhagem 5S55) e a avaliação da ação deste micro-organismo no desenvolvimento de mudas de alface em casa-de-vegetação, e o desenvolvimento das plantas transplantadas no campo.

3. Materiais e Métodos

3.1. Material biológico

3.1.1. Levedura rizosférica *Torulaspora globosa* (5S55)

A levedura avaliada neste projeto pertence à espécie *Torulaspora globosa* (linhagem 5S55); a linhagem foi selecionada como produtora de ácido indolacético (AIA), dentre mais de 300 isolados (dados não publicados) obtidos de amostras de rizosfera de cana-de-açúcar, de área do campus de Araras, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de São Carlos (latitude: 22º 21' 25" S e longitude: 47º 23' 03" W, altitude de 629 m); a linhagem se destacou dentre outras devido sua alta produção de AIA (mais de 800 µg.ml⁻¹ em 24 horas de incubação) e sua capacidade de solubilizar fosfato de cálcio *in vitro* (OLIVEIRA, 2016); além de controlar o desenvolvimento de fungos fitopatógenos em ensaios em cultivo pareado

em placa de Petri (BIZARRIA JUNIOR, 2016), indicando ação como agente de controle biológico. Desta forma, a linhagem foi caracterizada como potencial promotora de crescimento vegetal. A linhagem foi identificada através de técnicas de biologia molecular, com o sequenciamento da região D1/D2 - 28S do rDNA, com o uso dos primers NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (KURTZMAN e ROBNETT, 1997).

A linhagem 5S55 está armazenada no banco de micro-organismos do Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM), da Universidade Federal de São Carlos. Centro de Ciências Agrárias, campus de Araras/SP; está mantida em tubos de ensaio com meio inclinado YEPD (10 g.L⁻¹ extrato de levedura. 20 g.L⁻¹ peptona. 20 g.L⁻¹ dextrose e 15 g.L⁻¹ ágar), cobertas com óleo mineral, e mantidas em geladeira, a 8°C. Antes do início dos testes, a linhagem 5S55 foi reativada em placa Petri, também em meio YEPD, e incubada a 25°C até o desenvolvimento das colônias. Estas foram utilizadas para a inoculação de caldo batata marca Difco®, cultivadas por 48 horas à 120 rpm à 30°C, que foram utilizadas para preparo das suspensões utilizadas como inóculo, nos diferentes experimentos, sendo estes, compostos de células, suspensas em solução salina (NaCl 0,85%).

3.1.2. Alface (*Lactuca sativa* L.) cv. Crocantela

A espécie vegetal utilizada nos experimentos foi a alface (*Lactuca sativa* L), cultivar Crocantela. A cultivar escolhida para os testes apresenta características intermediárias entre alface crespa e americana, do tipo crocante, desenvolvida para adaptar-se às condições ambientais brasileiras. Possui número elevado de folhas espessas e coloração verde clara (FONTANA, 2016). Foram utilizadas sementes nuas cedidas pela empresa Fercam®, e utilizadas nos ensaios sem aplicação de defensivos para que não houvesse influência no desenvolvimento da levedura inoculada.

3.2. Avaliação do desenvolvimento de mudas de alface a partir de sementes inoculadas com *T. globosa* (5S55)

Este experimento foi realizado no meses de abril e maio de 2017 em casa-de-vegetação do GEHORT (Grupo de Estudo de Horticultura) do Centro de Ciências

Agrárias, da Universidade Federal de São Carlos, campus de Araras/SP. O índice médio de pluviosidade para esta área nos meses de experimento foi de 77 e 69 mm, para abril e maio, respectivamente. A temperatura foi de mínima de 14°C e máxima de 26°C, de acordo com site do ClimaTempo.

Antes da inoculação, as sementes foram desinfetadas com hipoclorito de sódio (0.625% de cloro ativo), seguida da lavagem com água destilada para remoção do excesso de cloro. Foram utilizadas em todo o experimento, 3200 sementes, sendo metade destas inoculadas com células de levedura; foi realizado o preparo de uma suspensão de células de levedura em concentração de 1×10^6 células.mL⁻¹, em solução salina (NaCl 0.85%) estéril, sendo aplicado 2 mL de suspensão em 20 g de semente, equivalente à 100 células por semente, em um saco plástico, e homogeneizadas com a movimentação do saco, para total distribuição das células da levedura nas sementes. Sementes não inoculadas (tratamento controle) foram apenas tratadas com solução salina estéril, nas mesmas condições descritas acima.

A semeadura foi realizada em substrato de fibra de coco da marca Amafibra®, distribuído em bandejas de plástico com 200 células, sendo colocada uma semente por célula, a 1 cm de profundidade. Após a semeadura, as bandejas foram mantidas em casa de vegetação. A umidade do substrato foi mantida na capacidade de campo, com reposição quando necessária através de irrigação por microaspersão de forma intermitente. Foi realizada ferti-irrigação 3 vezes por semana, com 1 L de solução hidropônica de alface bandeja⁻¹, cuja composição é 0.5 g.L⁻¹ de nitrato de cálcio, 0.5 g.L⁻¹ de nitrato de potássio, 0.35 g.L⁻¹ de sulfato de magnésio, 0.1 g.L⁻¹ de MAP e 0.03 g.L⁻¹ de micronutrientes (ConMicros®).

Além da microbiolização das sementes, foram realizadas inoculações da levedura aos 7 e/ou 15 dias após a emergência das plântulas de alface; os tratamentos estão descritos no Quadro 1. A inoculação das mudas foi realizada individualmente, sendo aplicado 1 mL da suspensão da levedura por planta, com 1×10^6 células.mL⁻¹, com o auxílio de pipeta automática. Nos tratamentos sem inoculação, foi aplicada a mesma quantidade de solução salina estéril (0.85% NaCl). No total foram considerados 8 tratamentos, sendo utilizadas 4 repetições de 100 plantas por tratamento.

Quadro 1. Descrição dos tratamentos de inoculação de leveduras em sementes e plântulas de alface cv. Crocantela.

TRATAMENTO	SEMENTES	INOCULAÇÃO 7 DAE*	INOCULAÇÃO 15 DAE
1	Não inoculado	Não inoculado	Não inoculado
2	Não inoculado	Não inoculado	Inoculado
3	Não inoculado	Inoculado	Não inoculado
4	Não inoculado	Inoculado	Inoculado
5	Inoculado	Não inoculado	Não inoculado
6	Inoculado	Não inoculado	Inoculado
7	Inoculado	Inoculado	Não inoculado
8	Inoculado	Inoculado	Inoculado

*DAE – dias após a emergência das plantas

Após o desenvolvimento das mudas, no momento ideal de seu transplante para o campo, 30 dias após semeadura, as mudas foram avaliadas quanto a altura da parte aérea, comprimento de raiz, largura e comprimento das folhas, sendo estas medidas realizadas com o auxílio de régua e paquímetro. Também foram avaliados o número de folhas, massa fresca da parte aérea e raiz, e massa seca da parte aérea e raiz; estas duas últimas análises foram realizadas com a secagem das plantas em estufa de secagem, a 60°C, até peso constante. Foram avaliadas 10 plantas por parcela, selecionadas ao acaso.

3.3. Avaliação da produção de alface em campo a partir de mudas inoculadas com *T. globosa* (5S55)

As mudas foram transplantadas para o campo, em área do GEHORT (Grupo de Estudo de Horticultura), no Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de São Carlos, campus de Araras/SP, nas mesmas condições de pluviosidade e temperatura descritas no item 3.2. A área apresenta solo tipo latossolo; este foi preparado com subsolagem, seguido de gradagem e uso de retroencanteiradeira para confecção dos canteiros. A adubação foi feita com 150 g de 04-14-08 NPK por metro quadrado de canteiro, aplicados 7 dias antes do transplante, de maneira

incorporada no canteiro, e após 12 dias foi aplicada 10 g por planta de 20-00-20 NPK em cobertura.

As mudas utilizadas neste experimento foram obtidas a partir do experimento descrito no item 3.2. O delineamento experimental consistiu em blocos ao acaso (Quadro 2), com 4 blocos por tratamento (mantendo os 8 tratamentos do experimento anterior), com 20 plantas por bloco (80 mudas por tratamento). As mudas transplantadas foram selecionadas da bandeja ao acaso, e plantadas utilizando espaçamento entre as linhas de 25 cm e entre as plantas de 30 cm.

Quadro 2. Delineamento experimental em blocos ao acaso utilizado no ensaio.

Bloco	Tratamento							
I	1	2	8	6	3	5	7	4
II	3	2	4	5	6	7	1	8
III	1	4	5	6	8	2	3	7
IV	6	8	5	7	2	1	3	4

As plantas foram mantidas no campo por 63 dias sob irrigação por aspersão com vazão de 200 L.h⁻¹, até o ponto horticultural (momento ideal de colheita). Foram avaliadas 5 plantas por bloco. As plantas foram retiradas do solo com o auxílio de uma faca. As plantas colhidas foram avaliadas quanto à altura da parte aérea, da base do caule até a maior medida da planta, tamanho e largura das folhas (foi escolhida uma folha do meio da planta, que representasse o padrão da planta toda) e tamanho do caule (essa medida foi feita com a desfolha total das plantas até sobrar apenas o caule, sendo medido do corte até o topo), sendo estas medidas realizadas com o auxílio de uma régua. Também foram avaliados o número de folhas, massa fresca e massa seca da parte aérea; esta última análise foi realizada com a secagem das plantas em estufa de secagem, a 60°C, até peso constante.

3.4. Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de LSD de Fisher a 5% de significância. As análises foram realizadas utilizando o software Statística V.7.

4. Resultados

4.1. Avaliação das mudas de alface cultivadas em casa-de-vegetação

Os resultados obtidos mostraram que para a variável altura de parte aérea, não houve diferença estatística entre os tratamentos avaliados (Figura 1). Para a variável comprimento de raízes, porém, a inoculação das sementes e da muda 7 e 15 dias após a emergência proporcionou prejuízo à planta, enquanto que a inoculação das sementes e da muda 15 dias após a emergência promoveu seu crescimento (Figura 2).

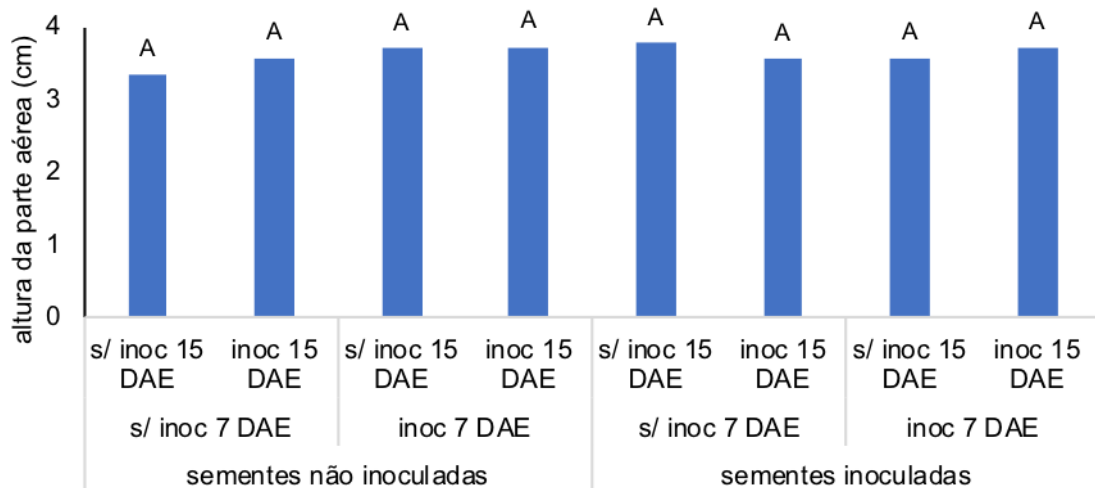


Figura 1. Altura média das mudas de alface cultivadas em casa-de-vegetação.

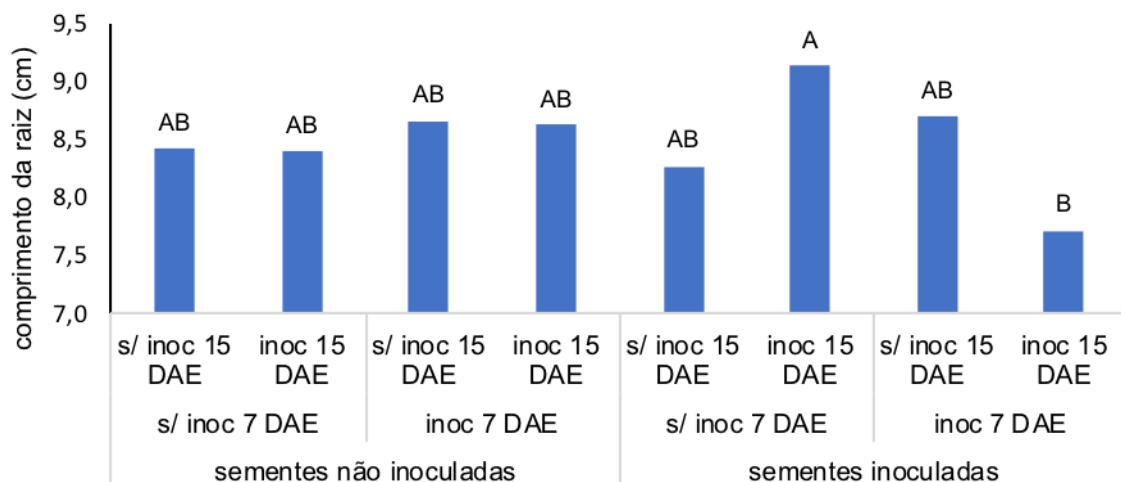


Figura 2. Comprimento médio de raiz das mudas de alface cultivadas em casa-de-vegetação.

Os resultados obtidos para a variável número de folhas das mudas foi similar ao obtido para comprimento de folha, sendo que a inoculação das sementes e da muda 7 e 15 dias após a emergência proporcionou os menores valores. O mesmo resultado porém, foi obtido no tratamento com inoculação das sementes e da muda após 15 dias de emergência. Estes foram inferiores ao tratamento com inoculação das sementes e inoculação 7 dias após a emergência (Figura 3).

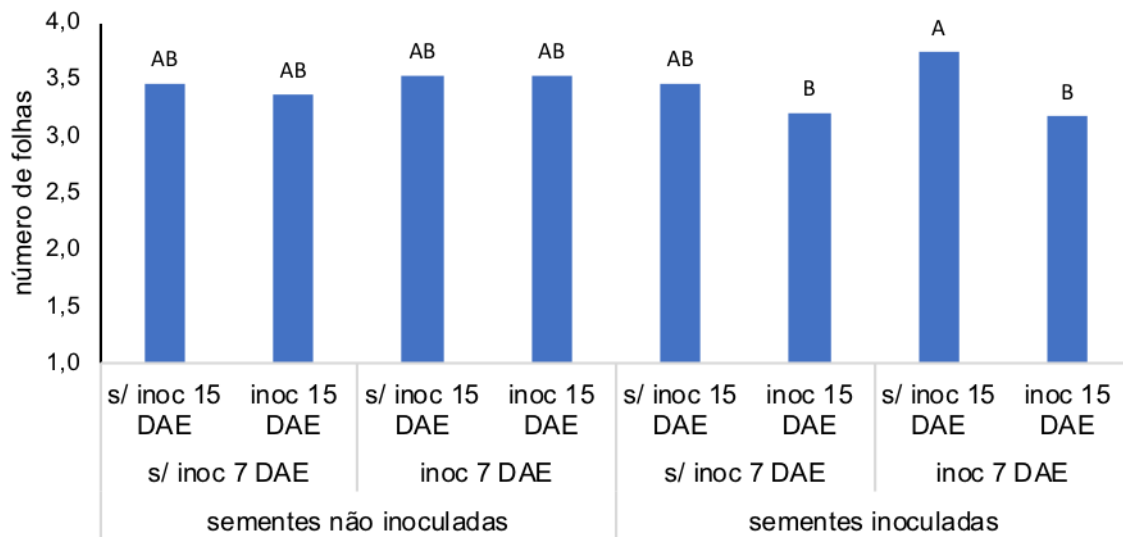


Figura 3. Número médio de folhas das mudas de alface cultivadas em casa-de-vegetação.

Para as variáveis largura de folha, comprimento de folha, peso fresco da parte aérea e raiz, e peso seco da parte aérea e raiz, o tratamento com a inoculação das sementes e das mudas 7 e 15 dias após a emergência proporcionou, estatisticamente, resultados que indicam a promoção de crescimento das mudas. O tratamento sem nenhuma inoculação ficou, dentre os tratamentos com menores valores nas mesmas variáveis (Figuras 4, 5, 6, 7, 8 e 9).

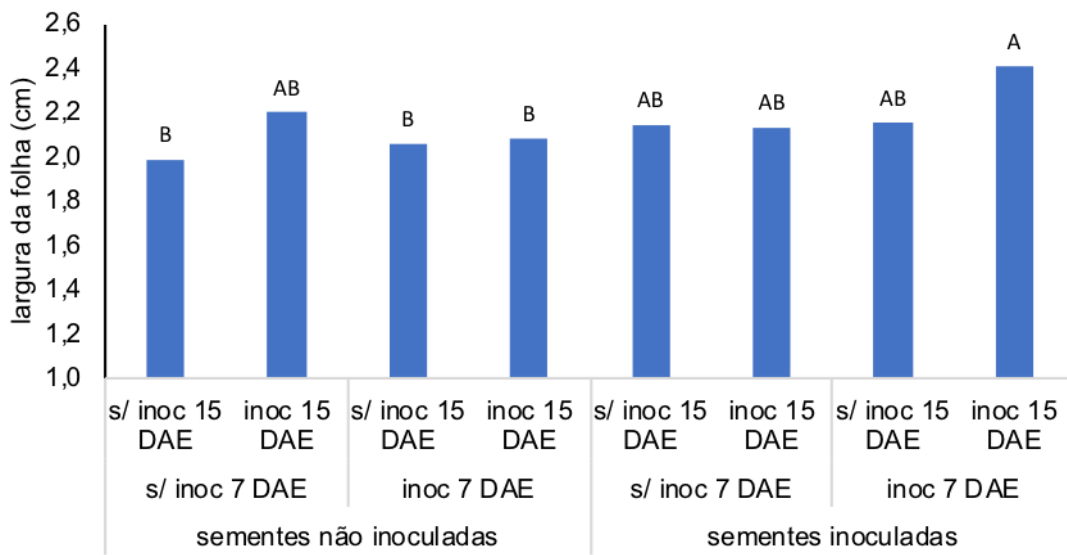


Figura 4. Largura média das folhas das mudas de alface cultivadas em casa-de-vegetação.

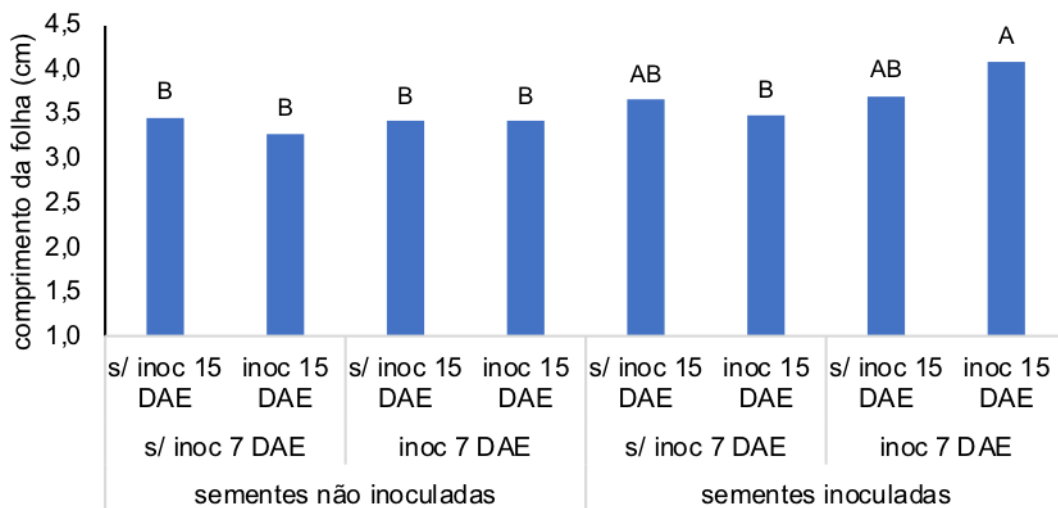


Figura 5. Comprimento médio das folhas das mudas de alface cultivadas em casa-de-vegetação.

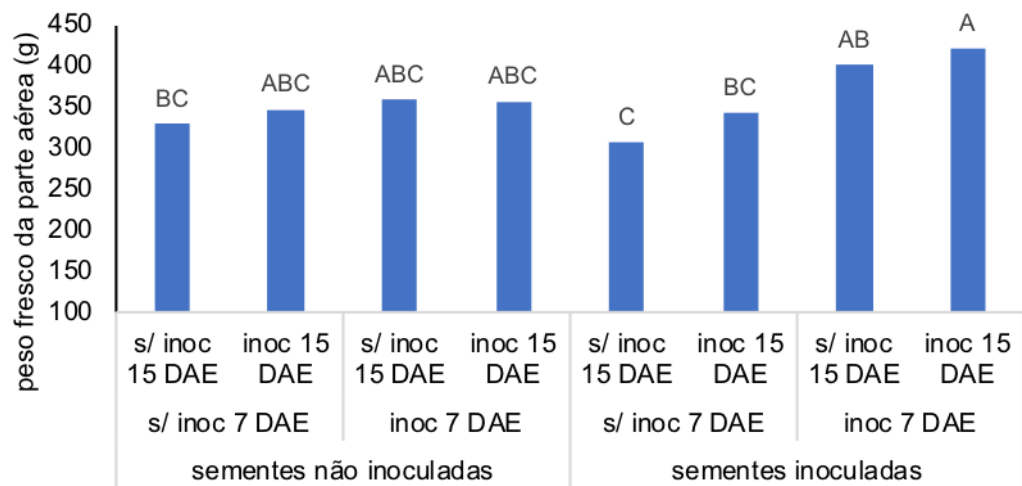


Figura 6. Peso fresco médio da parte aérea das mudas de alface cultivadas em casa-de-vegetação.

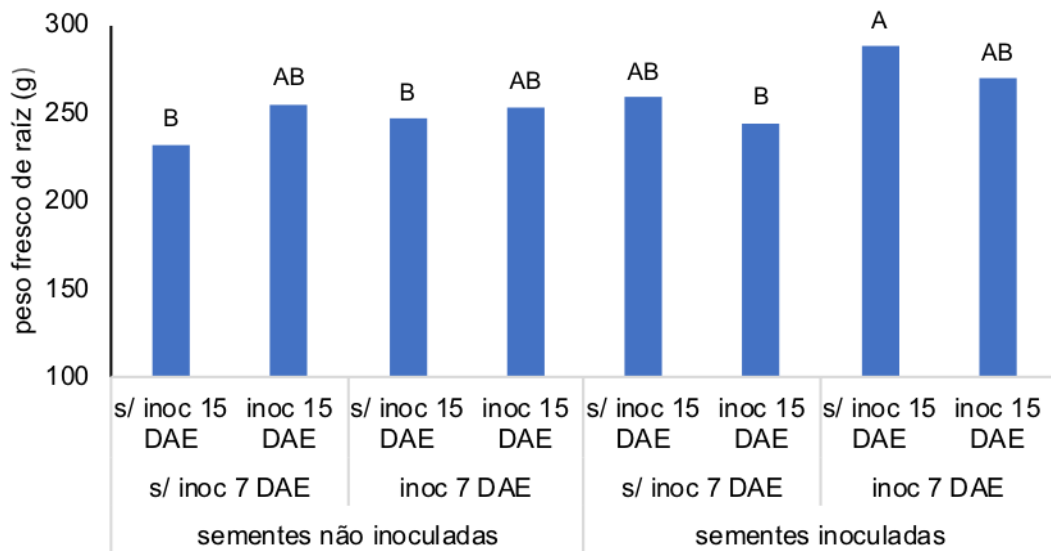


Figura 7. Peso fresco médio de raiz das mudas de alface cultivadas em casa-de-vegetação.

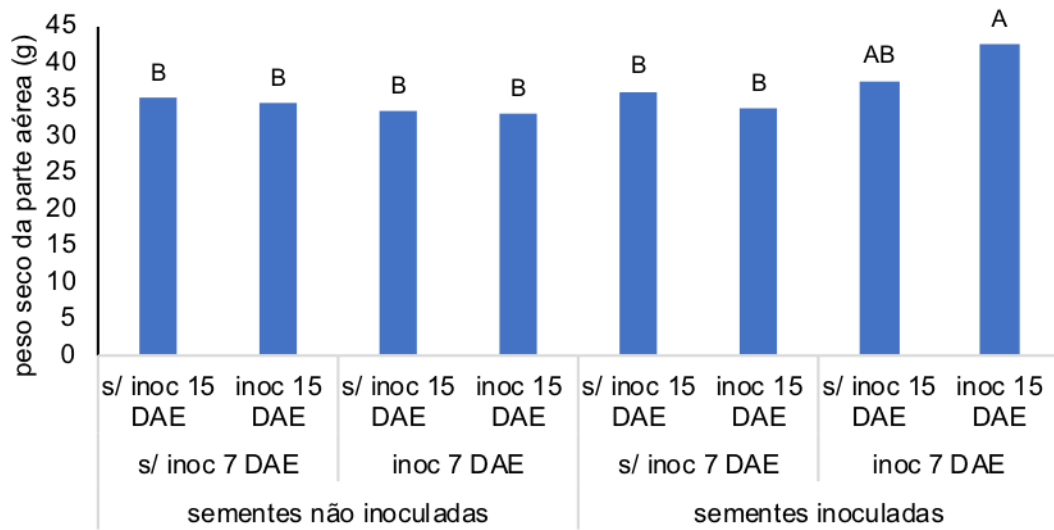


Figura 8. Peso seco médio da parte aérea das mudas de alface cultivadas em casa-de-vegetação.

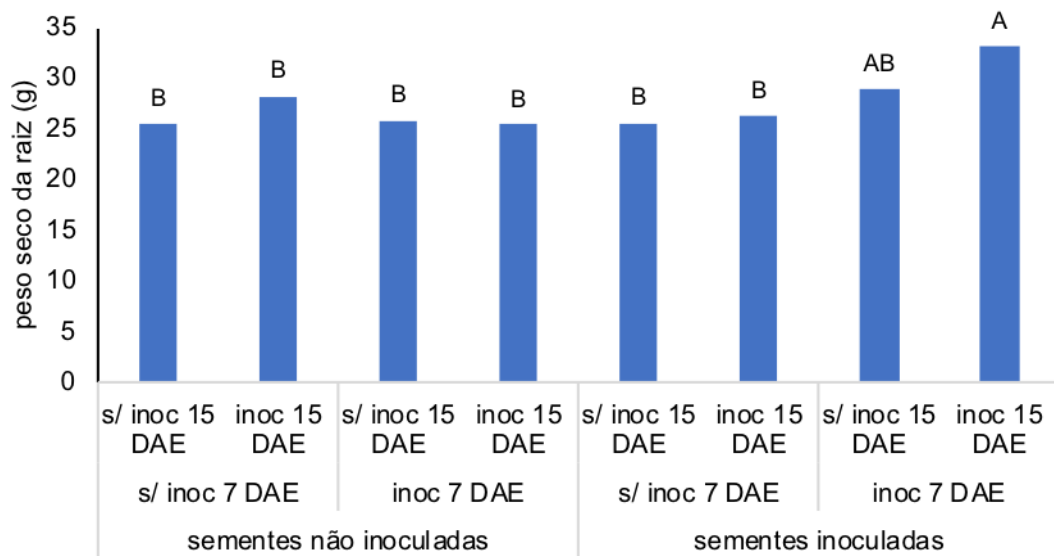


Figura 9. Peso seco médio de raiz das mudas de alface cultivadas em casa-de-vegetação.

4.2. Avaliação das plantas de alface no pós-transplante

Os resultados obtidos para a variável altura de planta mostram que mudas oriundas de sementes inoculadas apresentaram os melhores resultados, os quais foram estatisticamente superiores ao obtidos pelas plantas oriundas de mudas não inoculadas (Figura 10).

As plantas oriundas de mudas não inoculadas apresentaram resultados significativamente inferiores também para as variáveis número de folhas, comprimento e largura de folhas, e peso fresco de parte aérea. Para cada variável, porém, o tratamento que apresentou resultados estatisticamente superiores variou. Para número de folhas, os tratamentos os quais a muda recebeu inoculação 7 ou 15 dias após a emergência, e os tratamentos com inoculação das sementes sem inoculação das mudas, e com estas inoculadas 15 dias após a emergência, foram significativamente melhores (Figura 11).

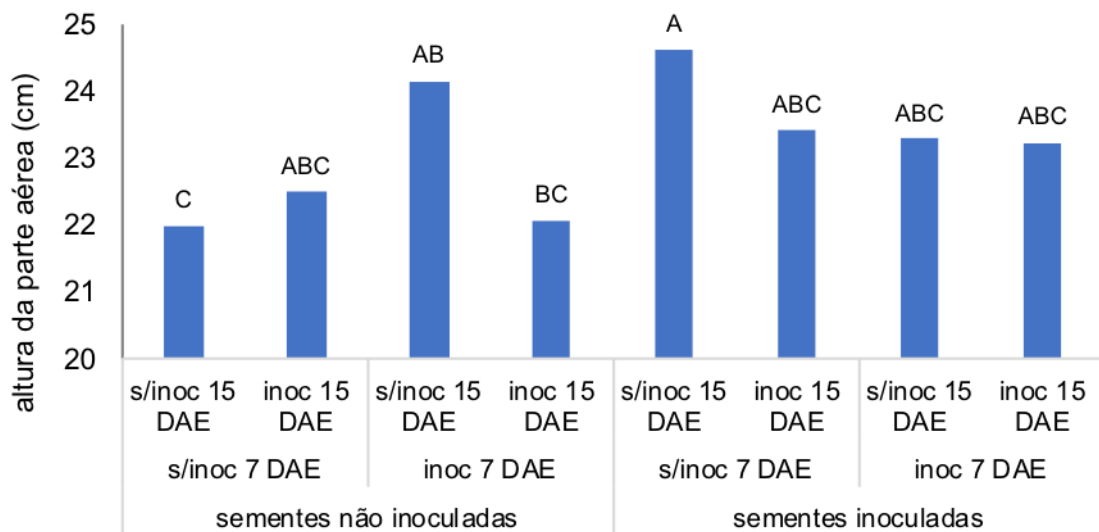


Figura 10. Altura média da parte aérea de plantas de alface transplantadas para o campo.

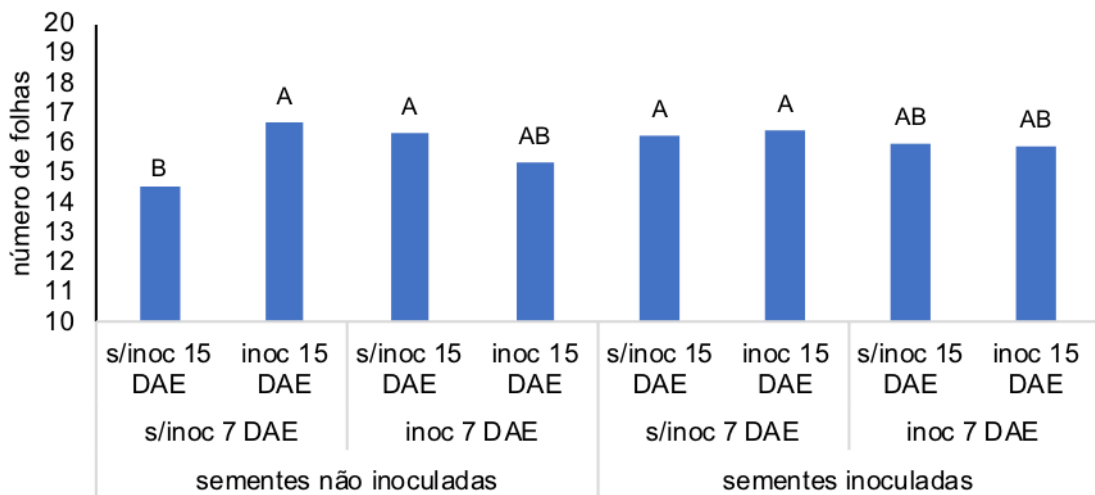


Figura 11. Número médio de folhas de plantas de alface transplantadas para o campo.

Para a variável comprimento de folhas, as plantas oriundas de mudas que receberam a inoculação apenas na semente apresentaram resultado estatisticamente superior às plantas não inoculadas (Figura 12).

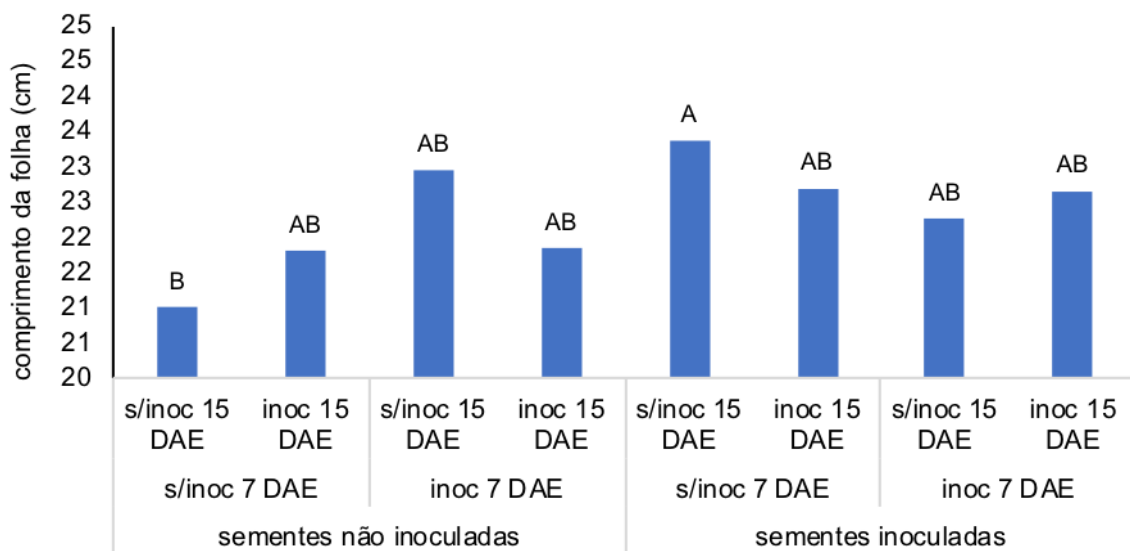


Figura 12. Comprimento médio das folhas de plantas de alface transplantadas para o campo.

Para a variável largura de folha, porém, as plantas oriundas de mudas que receberam inoculação apenas 7 dias após a emergência foram estatisticamente

superiores às plantas que não receberam nenhuma inoculação (Figura 13). Para a variável peso fresco da parte aérea, por sua vez, o tratamento com inoculação das sementes e inoculação das mudas 15 dias após a emergência se destacou e foi significativamente superior às plantas não inoculadas (Figura 15).

Comprimento de caule e massa seca da parte aérea foram variáveis que não apresentaram plantas com diferença estatística, isto é, para estas variáveis, a inoculação das sementes ou mudas com células de *T. globosa* não afetou as plantas de forma significativa no pós-colheita (Figuras 14 e 16).

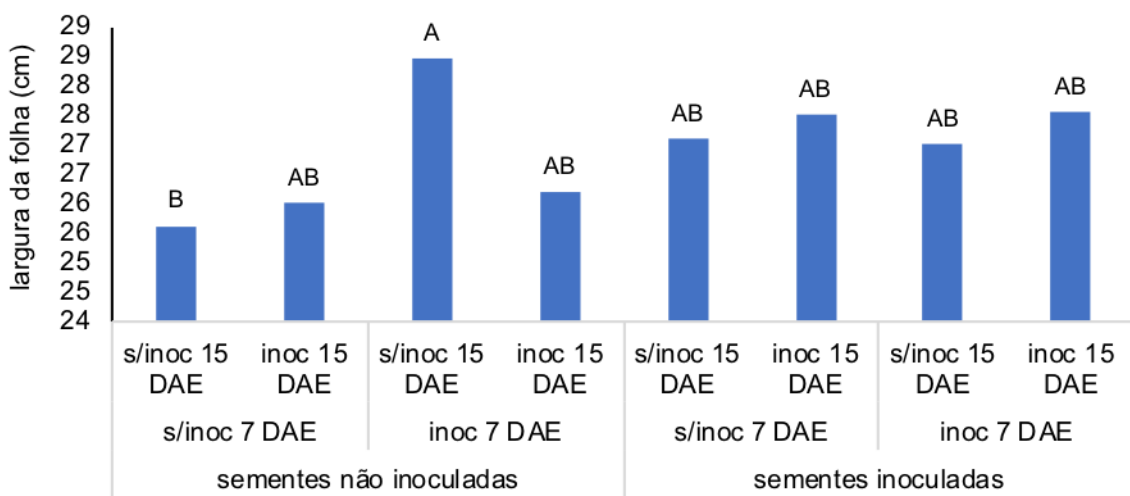


Figura 13. Largura média das folhas de plantas de alface transplantadas para o campo.

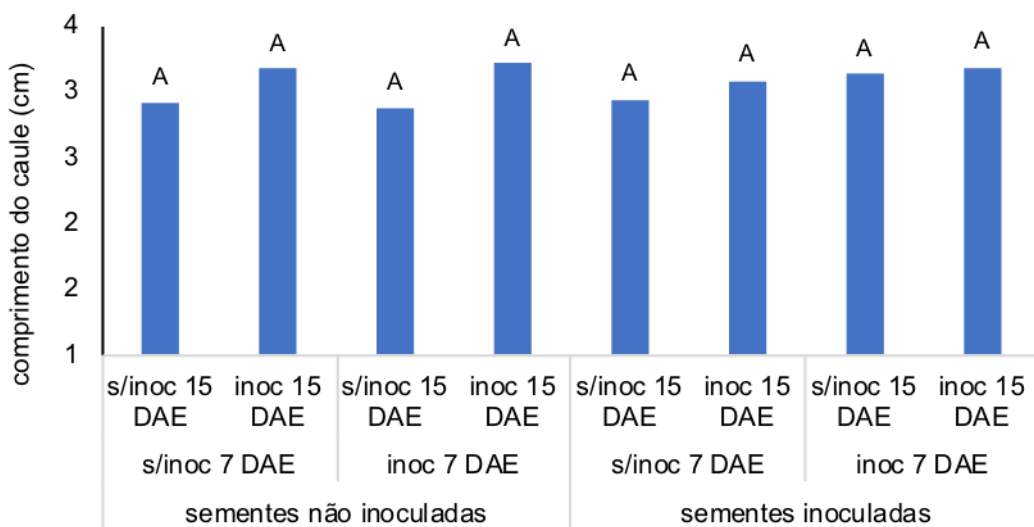


Figura 14. Comprimento médio de caule de plantas de alface transplantadas para o campo.

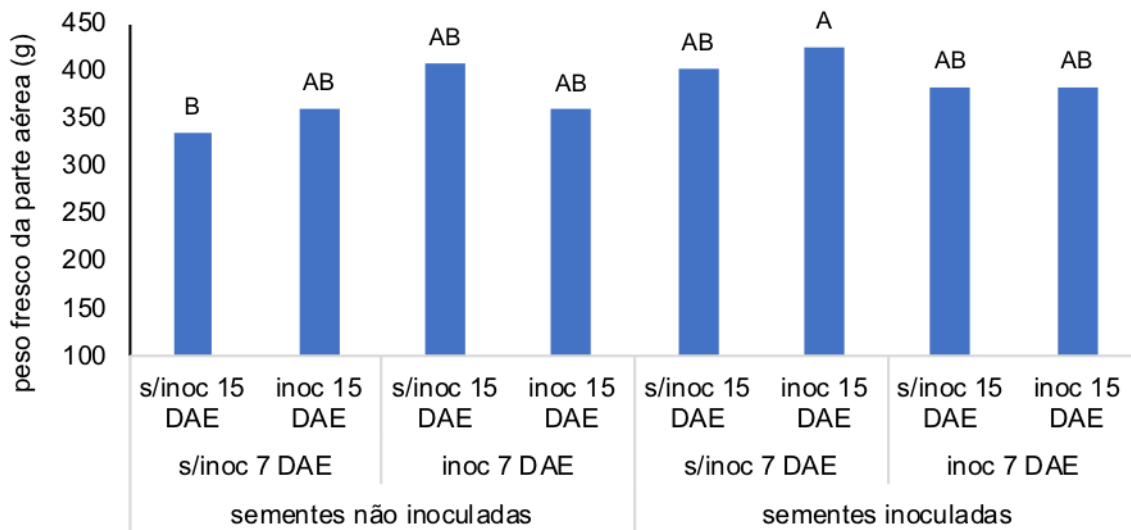


Figura 15. Peso fresco médio da parte aérea de plantas de alface transplantadas para o campo.

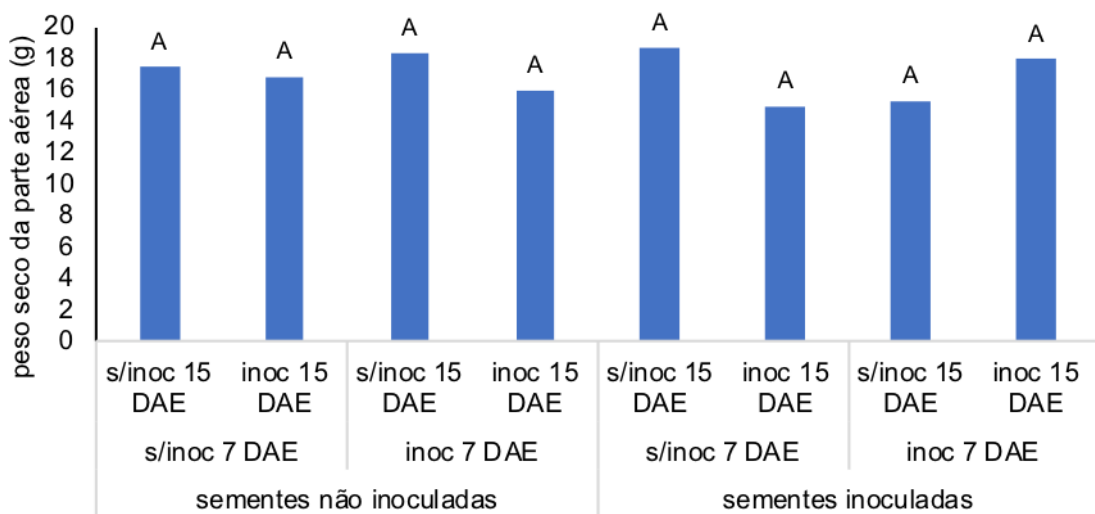


Figura 16. Peso seco médio da parte aérea de plantas de alface transplantadas no campo.

5. Discussão

A inoculação de leveduras para promoção de crescimento vegetal é uma área ainda pouco conhecida, com poucos trabalhos disponíveis, se comparado ao estudo de rizobactérias. A levedura objeto de estudo deste trabalho, da espécie *Torulaspora*

globosa, porém, tem sido isolada de forma recorrente da rizosfera de cana-de-açúcar e milho (dados não publicados), e se destaca nos processos de *screening* quanto a caracterização dos isolados como promotores de crescimento (alta produção de ácido indolacético (AIA), alta capacidade de solubilização de fosfato e eficiente no controle de fitopatógenos), todos em ensaios *in vitro* (ROSA, 2009; OLIVEIRA, 2016; BIZARRIA JUNIOR, 2016). Observa-se os excelentes resultados obtidos pela levedura *T. globosa in vitro* se repetem em ensaios *in vivo* foi o objetivo deste trabalho.

Neste capítulo foi apresentado os resultados obtidos a partir da simples inoculação das células de *T. globosa* (5S55) nas sementes e mudas de alface, em ambiente sem controle (casa-de-vegetação e campo). É importante lembrar que o inóculo utilizado não apresentou nada além de células, isto é, não foi avaliado o uso de formulação que proporcionasse algum tipo de proteção às células, ou adição de nutrientes para favorecer o estabelecimento da levedura na planta.

Dentre os resultados observados para as mudas, em casa-de-vegetação, um que se destacou foi que o tratamento com as inoculações da semente e muda proporcionou mudas com raízes menores, em relação ao comprimento, porém com aumento significativo de massa fresca e seca. Sabe-se que a ação de microorganismos rizosféricos promotores de crescimento pode estimular o desenvolvimento de ramificações e pêlos radiculares, os quais são benéficos, pois proporcionam maior superfície de absorção de nutrientes pela planta. Nestes casos, o comprimento da raiz nem sempre acompanha o incremento de massa seca total, ocorrendo o contrário, isto é, uma diminuição do comprimento da raiz, com alteração anatômica (IDRIS et al. 2007). Esta alteração é causada pela presença de AIA que, em determinadas concentrações, inibe o desenvolvimento da raiz principal e estimula o desenvolvimento de raízes secundárias e adventícias, o que resulta em um maior volume radicular (TAIZ e ZEIGER, 2009).

Outro resultado observado nas mudas de alface diz respeito ao número de folhas, que se apresentou significativamente inferior nas plantas inoculadas com a levedura nas sementes e 7 e 15 dias após emergência; os valores de largura e comprimento das folhas, porém, foi significativamente superior, mostrando que a inoculação da levedura proporcionou plantas menos folhosas, porém mais compridas e largas, fato que se refletiu nos resultados de massa fresca e massa seca da parte aérea.

A inoculação de plantas com micro-organismos produtores de AIA é descrita como eficiente na promoção de crescimento de diversas culturas; Youseif (2018) verificou incremento em peso fresco e seco da parte aérea e radicular de plântulas de milho inoculadas com *Chryseobacterium* sp. e *Flavobacterium* sp., ambos produtores de AIA, em ensaios de casa de vegetação. *Burkholderia contaminans*, bactéria produtora de AIA, também se mostrou eficiente em promover crescimento vegetal através de ensaio em casa de vegetação, incrementando peso seco de parte aérea e raiz de milho (TAGELE et al., 2018). A bactéria *Bacillus methylotrophicus*, além de produtora de AIA, também produz giberelina, o que resultou em uma promoção do crescimento de plantas de alface, evidenciados principalmente pelo ganho de peso fresco (RADHAKRISHNAN e LEE, 2016).

Apesar de menos estudadas que as rizobactérias, diversas espécies de leveduras rizosféricas são capazes de produzir AIA, e apresentam resultados satisfatórios na promoção de crescimento de diversas culturas. A espécie *Williopsis saturnus* (yeast 4) endofítica de milho e produtora de AIA, promoveu crescimento de milho (parte aérea e raiz) em ensaios em casa-de-vegetação (NASSAR et al., 2009). Amprayn et al. (2012) avaliou a ação da espécie *Candida tropicalis* (CtHY), produtora de AIA, no desenvolvimento de arroz, e observou aumento de 35% na massa seca das raízes.

Os resultados obtidos nas mudas de alface se refletiram nas plantas no campo; as plantas inoculadas (semente e 15 dias após emergência) apresentaram aumento significativo em produtividade da alface, quando observado o peso fresco da parte aérea e o número de folhas. Este resultado mostra que a levedura *T. globosa* foi eficiente em promover o crescimento da cultura. O resultado de maior produção pode ser vinculado a um melhor desenvolvimento radicular, estimulado pelo AIA, produzido pela levedura. O melhor desenvolvimento radicular culmina em uma melhor absorção de nutrientes. A capacidade da levedura em se estabelecer na raiz da planta, porém, é fator imperativo para que os resultados de incremento de desenvolvimento vegetal sejam observados. Apesar da levedura *T. globosa* (5S55) ter sido isolada de cana-de-açúcar, nossos resultados mostram que foi capaz de se desenvolver na raiz de alface e promover seu desenvolvimento.

Muitos micro-organismos possuem especificidade quanto à planta, e não somente em relação à colonização, como também à resposta aos estímulos ambientais (TABASSUM et al., 2017), por isso resultados podem variar conforme a

espécie ou cultivar avaliada. Neste trabalho a cultivar Crocantela foi escolhida para os testes, por ser uma cultivar nova de alface, e por ainda não apresentar trabalhos quanto a sua resposta à inoculação por MPCV. Muitos micro-organismos, podem promover crescimento vegetal em diversas culturas, como é o caso da bactéria *Azospirillum brasilense*; esta espécie de bactéria tem sido isolada de diversas culturas, como milho e arroz, e atualmente diversos trabalhos comprovam a sua eficiência como promotora de crescimento em diferentes culturas (CASSÁN e DIAS-ZORITA, 2016), como é o caso do uso em feijão comum (REMANS et al, 2007), e em alface, aumentando a taxa de germinação e estimulando o crescimento após estresse salino, com o aumento do número de folhas, altura de plantas e comprimento de raiz (MANGMANG et al., 2015; BASSARI et al. 2006).

A ação da levedura *T. globosa* (5S55) como promotora de crescimento vegetal foi avaliada anteriormente por Oliveira (2016); em seu trabalho avaliou a inoculação de mudas transplantadas de tomate com células da levedura, e observou incremento significativo no desenvolvimento das plantas inoculadas em casa-de-vegetação. Experimentos que avaliem formas de inoculação e concentração de células no inóculo, porém, devem ser realizados. Além disso, a análise do estabelecimento da espécie na raiz da planta é necessária, além da avaliação da planta quanto a sua nutrição, visto que o estímulo ao desenvolvimento radicular e a melhor absorção de nutrientes pela planta podem explicar o incremento em seu desenvolvimento.

6. Conclusões

A partir dos resultados obtidos podemos concluir que a inoculação das sementes e mudas de alface cv. Crocantela, com a levedura rizosférica *T. globosa* (linhagem 5S55) proporcionou aumento de massa de raízes nas mudas, e de incremento significativo de produção de alface, em condições de campo.

7. Literatura citada

AMPRAYN K.; ROSE, M.R.; KECSKÉS, M.; PEREG, L.; NGUYENM H.T.; KENNEDY, I.R. Plant growth promoting characteristics of soil yeast (*Candida tropicalis* HY) and its effectiveness for promoting rice growth. **Applied Soil Ecology**, v. 61, p. 295-299, 2012.

BASSARI, C.A.; AYRAULT, G.; CREUS, C.M.; SUELDO, R.J.; SOBRERO, M.T. Seed inoculation with *Azospirillum* mitigates NaCl effects on lettuce. **Scientia Horticulturae**, v. 109, n, 1 p. 8-14, 2006.

BIZARRIA JUNIOR, R.; BOSQUEIRO, A.S.; ROSA-MAGRI, M.M. Potencial de *Torulaspora globosa* e *Rhodotorula mucilaginosa* como agentes de controle biológico de *Alternaria alternate*. **VI Simpósio Agroambiental e Jornada Agrônômica**, Araras, 2016.

CASSÁN, F.; DIAZ-ZORITA, M. *Azospirillum* sp. in current agriculture: From the laboratory to the field. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 103, p. 117-130, 2016.

CLEMENTE, J.M.; CARDOSO, C.R.; VIEIRA, B.S.; FLO, I.M.; COSTA, R.L. Use of *Bacillus* spp. as growth promoter in carrot crop. **African Journal of Agricultural Research**. v. 11, n. 35, 2016.

ETESAMI, H.; MAHESHWARI, D. Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promote traits in stress agriculture: Action mechanisms and future prospects. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 156, p. 225-246, 2018.

FASCIGLIONE, G; CASANOVAS, E.M.; QUILLEHAUQUY, V.; YOMMI, A.K.; GOÑI, M.G.; ROURA, S.I.; BARASSI. C.A. *Azospirillum* inoculation effects on growth. product quality and storage life of lettuce plants grown under salt stress. **Scientia Horticulturae**, v. 195, p 154-162, 2015.

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.

LAMICHHANE, J.R.; DACHBRODT-SAAAYDEH S.; KUDSK P.; MESSÉANM A. Toward a reduced reliance on conventional pesticides in European agriculture. **Plant Disease**. v. 100, n. 1, p. 10-24, 2016.

LUDWIG-MÜLLER, J. Bacteria and fungi controlling plant growth by manipulating auxin: balance between development and defense. **Journal of Plant Physiology**, v. 172, p. 4-12, 2015.

LUGTENBERG, B.J.J.; CHIN-A-WOENG, T.F.C.; BLOEMBERG, G.V. Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 81, p. 373-383, 2002.

MANGMANG J.S.; DEAKER, R.; ROGERS, G. Early seedling growth response of lettuce, tomato and cucumber to *Azospirillum brasilense* inoculated by soaking and drenching. **Horticultural Science**, v. 42, p. 37-46, 2015.

NASSAR, A.; EL-TARALIBY, K.; 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.

ODOH, C.K. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a bioprotectant bioinoculant for sustainable agrobiolgy. A review. **International Journal of Advanced Research in Biological Sciences**. v. 4, p. 123-142, 2017.

OLIVEIRA, B.T. Leveduras produtoras de AIA e solubilizadoras de P visando a promoção de crescimento de tomateiro. 65p. **Dissertação (mestrado)**- Universidade Federal de São Carlos, 2016.

PRIYADHARSINI, P.; MUTHUKUMAR, T. The root endophytic fungus *Curvularia geniculata* from *Parthenium hysterophorus* roots improves plant growth through phosphate solubilization and phytohormone production. **Fungal Ecology**, v. 27, p. 69-77, 2017.

RADHAKRISHNAN, R.; LEE, I.J. Gibberellins producing *Bacillus methylotrophicus* KE2 supports plant growth and enhances nutritional metabolites and food values of lettuce. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 109, p. 181-189, 2016.

ROSA, M.M. Avaliação de leveduras isoladas de áreas agrícolas como agentes no controle biológico de fitopatógenos. 121f. **Tese (Doutorado)** – Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro. Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, 2009.

ROSA-MAGRI, M.M.; AVANSINI, S.H.; LOPES-ASSAD, M.L.; TAUKE-TORNISIELO, S.M.; CECCATO-ANTONINI, S.R. Release of potassium from rock powder by the yeast *Torulaspota globosa*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, 2012.

SARABIA, M.; CAZARES, S.; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, A.; MORA, F.; CARREÓN-ABUD, Y.; LARSEN, J. Plant growth promotion traits of rhizosphere yeasts and their response to soil characteristics and crop cycle in maize agroecosystems. **Rhizosphere**, v. 6, p. 67-73, 2018.

SHAO, J.; XU, Z.; ZHANG, N.; SHEN, Q.; ZHANG, R. Contribution of indole-3-acetic acid in the plant growth promotion by the rhizospheric strain *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. **Biology and Fertility of Soils**. v. 51, p. 321-330, 2015.

SIDIBÉ, Y.; FOUADI, S.; PASCUAL, U.; TERMANSEN, M. Adaptation to climate change in rainfed agriculture in the global South: Soil biodiversity as natural insurance. **Ecological Economics**, v. 146, p. 588-596, 2018.

TABASSUMA, B.; KHANB, A.; TARIGA, M.; RAMZANC, M.; KHANA, M.S.I.; SHAHIDA, N.; AALIYAA, K. Bottlenecks in commercialization and future prospects of PGPR. **Applied Soil Ecology**, v. 121, p. 102-117, 2017.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. Artmed Editora. 848p. 2009.

TAGELE, S.B.; KIM, S.W.; LEE, H.G.; KIM, H.S.; LEE, Y.S. Effectiveness of multi-trait Burkholderia contaminants KNY17BI1 in growth promotion and management of banded leaf end sheath blight in maize seedling. **Microbiological Research**, v. 214, p. 8-18, 2018.

ZAIDI, A.; AHMAD, E.; KHAN, M.S.; SAIF, S.; RIZVI, A. Role of plant growth promoting rhizobacteria in sustainable production of vegetables: current perspective. **Scientia Horticulturae**, v. 193, p. 231-239, 2015.

YOUSEIF, S.H. Genetic diversity of plant growth promoting rhizobacteria and their effects on the growth of maize plants under greenhouse conditions. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 63, p. 25-35, 2018.

CAPÍTULO 2. Avaliação da germinação e desenvolvimento inicial de alface inoculado com a levedura rizosférica *Torulaspora globosa* e seus metabólitos em condições controladas

1. Resumo

Este trabalho teve por objetivo avaliar a ação da levedura *T. globosa* e seus metabólitos na germinação e desenvolvimento inicial de alface, em condições controladas. Para tanto, sementes das cultivars Crocantela e Valentina foram pré-germinadas em caixas gerbox com papel estéril umedecido com suspensão de células da levedura e/ou seus metabólitos (resultado do seu cultivo por 48 horas), na presença ou não de triptofano. Foram realizadas análise de porcentagem e velocidade de germinação 4 e 7 dias após o início do experimento. Após 5 dias as plântulas foram transferidas para tubos Falcon com meio MS semi-sólido, nos quais permaneceram por 6 dias, quando foram realizadas análises de área foliar, área e volume radicular, comprimento da raiz e número de pontas de raiz. O ápice radicular das plântulas também foi avaliado sob microscópio, para avaliação do número e tamanho dos pêlos radiculares. Um segundo experimento foi realizado semeando a cultivar Valentina diretamente em tubos Falcon com meio MS semi-sólido tratado com células de *T. globosa* e/ou seus metabólitos, com e sem triptofano, além da inoculação de duas linhagens da bactéria *Azospirillum brasiliense*, isoladas ou em associação com a levedura. Os resultados mostraram que o tratamento das sementes das cultivares Crocante e Valentina não afetou significativamente a germinação. As plântulas, porém, da cultivar Crocantela apresentaram raízes menores e com menor área quando tratadas com a levedura e seus metabólitos. Os metabólitos, por sua vez, com triptofano (T7) proporcionou maior diâmetro de raiz, diferindo do tratamento controle (T1). Os dados obtidos pela cultivar Valentina diferiram, sendo que o tratamento com a levedura, seus metabólitos e adição de triptofano (T5) foi o que proporcionou os melhores resultados, com destaque para as variáveis volume e área de raiz, e número de pontas de raízes. Os tratamentos com adição de triptofano (com levedura ou metabólitos) foram os que apresentaram os resultados menos satisfatórios para o desenvolvimento das plântulas. Foi possível

observar que o tratamento 5 também mostrou ser o melhor no estímulo a produção de pêlos radiculares para a cultivar Valentina. A adição da bactéria *A. brasilense*, isolada e em co-inoculação com a levedura, não promoveu crescimento significativo das plantas de alface da cultivar Valentina.

Palavras-chave: promoção de crescimento vegetal; condições gnotobióticas; Crocantela; Valentina; *Azospirillum brasilense*; co-inoculação.

2. Introdução

A alface é a mais conhecida dentre as hortaliças folhosas, sendo cultivada em quase todas as regiões do planeta (ZIECH et al., 2014), sendo uma cultura de ciclo curto, variando de 45 a 60 dias, dependendo da cultivar e época. O mercado brasileiro tem preferência pelas cultivares de alface crespa, e dessa forma, existem programas de melhoramento genético para adaptar as cultivares ao nosso clima (SALA e COSTA, 2012).

Os micro-organismos promotores de crescimento vegetal (MPCV) se encontram especialmente na rizosfera das plantas, atraídos pelos exsudatos radiculares (ODOH, 2017), e utilizam-se de diversas estratégias para atuar, como por exemplo a produção de hormônios vegetais, como auxinas, fixação de nitrogênio, solubilização de fósforo, controle de patógenos, entre outros (SUAREZ et al., 2014; GOPALAKRISHNAN et al., 2017; PEREG; MCMILLAN, 2014). Leveduras estão presentes em diversos ambientes naturais, como solo, rizosfera, folhas, entre outros ambientes, porém, não são tão estudados como MPCV como as bactérias e os fungos filamentosos (NASSAR et al., 2005). A levedura *Torulaspora globosa* foi isolada de cana-de-açúcar, e mostrou-se capaz de produzir compostos promotores de crescimento vegetal, como AIA e ácidos orgânicos solubilizadores de fosfatos (OLIVEIRA, 2016; ROSA, 2009; ROSA-MAGRI et al., 2012).

A produção de hormônios vegetais pelos MPCV contribui com o crescimento das plantas, ajudando na resposta a fatores ambientais, bióticos e abióticos (DODD et al.; 2010). O principal hormônio estudado é o ácido indolacético (AIA), do grupo das auxinas, responsável pela divisão celular, polarização, expansão e diferenciação celular, além do desenvolvimento de órgãos, como raiz lateral e adventícia e dominância apical (LUDWIG-MÜLLER, 2014). Dentre os micro-organismos produtores de AIA, a maioria possui o aminoácido L-triptofano (L-TRP) como

precursor (LIU et al., 2016), e diversos trabalhos sugerem que seu efeito promotor de crescimento é aumentado quando utilizada fonte exógena de L-TRP (MUSTAFA et al.; 2018; IDRIS et al., 2007). Fu et al. (2016) mostraram que *T. globosa* produz cerca de oito vezes mais AIA em meio de cultura contendo 0,1% de L-TRP em relação ao meio sem o precursor. Os efeitos de leveduras promotoras de crescimento vegetal foram pouco elucidados até o momento, e levantam questionamentos dos principais mecanismos de ação. Através de estudos gnotobióticos, é possível isolar e elucidar efeitos primários do micro-organismo no crescimento inicial da planta, podendo responder questões quanto ao efeito da associação micro-organismo-planta.

Considerando o exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar, em condições controladas, a ação da levedura *T. globosa* (5S55), seus metabólitos e triptofano na germinação e desenvolvimento inicial das cultivares de alface Crocanela e Valentina; além disso foi avaliada a ação da inoculação da bactéria diazotrófica *Azospirillum brasilense*, isolada e em associação com a levedura *T. globosa* (5S55) no desenvolvimento inicial de alface, cultivar Valentina.

3. Materiais e Métodos

3.1. Material biológico

3.1.1. Levedura rizosférica *Torulaspota globosa* (linhagem 5S55)

A levedura avaliada neste projeto pertence à espécie *Torulaspota globosa* (linhagem 5S55); a linhagem foi isolada de rizosfera de cana-de-açúcar, de área da Universidade Federal de São Carlos, campus de Araras/SP (detalhes no item 3.1 do Capítulo 1). Após seleção (dados não publicados) a linhagem foi escolhida por ser produtora de ácido indolacético (AIA), solubilizadora de fosfato de cálcio *in vitro* (OLIVEIRA, 2016) e agente de controle biológico de fitopatógenos (BIZARRIA JUNIOR, 2016); desta forma, foi caracterizada como potencial promotora de crescimento vegetal. A linhagem foi identificada através de técnicas de biologia molecular, com o sequenciamento da região D1/D2 - 28S do rDNA, com o uso dos primers NL1 e NL4 (KURTZMAN; ROBNETT, 1997).

A linhagem 5S55 está armazenada no banco de micro-organismos do Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM), da Universidade

Federal de São Carlos. Centro de Ciências Agrárias, campus de Araras/SP; está mantida em tubos de ensaio com meio inclinado YEPD (10 g.L⁻¹ extrato de levedura. 20 g.L⁻¹ peptona. 20 g.L⁻¹ dextrose e 15 g.L⁻¹ ágar), cobertas com óleo mineral, e mantidas em geladeira, a 8°C. Antes do início dos testes, a linhagem 5S55 foi repicada em placa Petri, também em meio YEPD, e incubada a 25°C até o desenvolvimento das colônias. Estas foram utilizadas para o preparo das suspensões utilizadas como inóculo, nos diferentes experimentos, sendo estes, compostos de células, suspensas em solução salina (NaCl 0,85%).

3.1.2. Alface (*Lactuca sativa* L.) cv. Crocantela e cv. Valentina

A espécie vegetal utilizada nos experimentos foi a alface (*Lactuca sativa* L), cultivar Crocantela e Valentina. Foram utilizadas sementes pelletizadas sem pré-tratamento, sendo a cultivar Crocantela cedida pela empresa Fercam[®], e a cultivar Valentina, da empresa Sakata[®].

3.2. Preparo do inóculo (células) ou produto derivado do cultivo (metabólito) de *Torulaspota globosa* (5S55)

A levedura foi cultivada em frasco erlenmeyer de 500 ml, com 200 ml de meio de cultura caldo batata, preparado conforme indicação do fornecedor (marca Difco) acrescido ou não de 1 g/L de triptofano. Os frascos foram mantidos em incubadora refrigerada com agitação à 120 rpm, 30°C por 48 h. Após o cultivo, foram preparados os seguintes produtos, conforme o tratamento, de acordo com a tabela 1 abaixo:

Tabela 1. Tratamentos utilizados nos ensaios de crescimento inicial de alface com levedura e metabólitos.

	Tratamentos	Meio de cultura	AIA (μg)/planta	Levedura (UFC)/planta
1	Testemunha	Solução Fisiológica	0	0
2	Levedura + Metabólito	Caldo Batata	$4,00 \times 10^{-5}$	1×10^5
3	Levedura	Caldo Batata	0	1×10^5
4	Metabólito	Caldo Batata	$4,00 \times 10^{-5}$	0
5	Levedura + Metabólito	Caldo Batata + 1g/L triptofano	$6,60 \times 10^{-4}$	1×10^5
6	Levedura	Caldo Batata + 1g/L triptofano	0	1×10^5
7	Metabólito	Caldo Batata + 1g/L triptofano	$6,60 \times 10^{-4}$	0

A levedura (tratamentos 3 e 6) foi obtida através da centrifugação do cultivo, retirada do sobrenadante e ressuspensão do pellet formado com solução fisiológica (0,85% NaCl). O metabólito (tratamentos 4 e 7) foi obtido através da filtração com filtro de membrana 0,22 μm do sobrenadante gerado na etapa anterior.

A concentração de AIA no metabólito resultante do cultivo da levedura, utilizado nos tratamentos 5 e 7, foi determinada através de técnica colorimétrica com reação com reagente de Salkowsky (GLICKMANN; DESSAUX, 1995).

Para obtenção das concentrações utilizadas, em todos os tratamentos foi realizada uma diluição de 100x do cultivo original.

3.3. Tratamento das sementes de alface com células e/ou metabólito do cultivo de *T. globosa* (5S55).

Foram preparadas caixas tipo gerbox com papel filtro estéril, sendo utilizadas 3 caixas por tratamento, com 25 sementes por caixa (Figura 1).

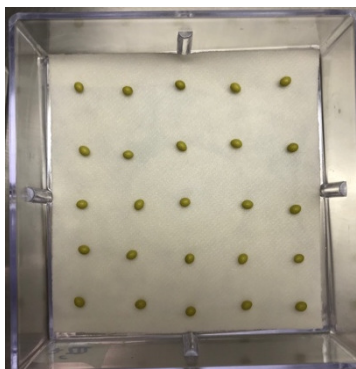


Figura 1. Caixa tipo gerbox com 25 sementes de alface da cultivar Crocantela.

Cada caixa gerbox recebeu umidade de 2,5 vezes o peso do papel filtro, o qual foi distribuído entre 4 mL de água destilada estéril e 2,5 mL do composto, de acordo com o tratamento. Os tratamentos utilizados foram os descritos na tabela 1.

As caixas foram mantidas, após o tratamento, no escuro, em incubadora à 20°C, por 3 dias. Após esse período, foram mantidas sob fotoperíodo de 12h com temperatura de 25°C. As sementes foram avaliadas a partir do 3° dia até o 7° dia de tratamento.

3.3.1. Avaliação da germinação das sementes de alface tratadas com células ou metabólitos do cultivo de *T. globosa*

Para avaliação da germinação das sementes de alface tratadas, foram realizadas a contagem das sementes germinadas após 4 e 7 dias, conforme as regras para análise de sementes (BRASIL, 2009).

O índice de velocidade de germinação (IVG) foi calculada utilizando os dados de contagem de sementes germinadas do 4° ao 7° dia (contagens diárias). Para obter-se o IVG, utiliza-se a porcentagem de plântulas, dividida pelo dia em que foi realizada a contagem das sementes germinadas, de acordo com a fórmula abaixo:

$$IVG = G1/N1 + G2/N2 + \dots + Gn/Nn$$

onde: G1, G2, Gn = porcentagem de plântulas germinadas na primeira, segunda e última contagem; N1, N2, Nn= número de dias após a semeadura na primeira, segunda e última contagem. Os dados foram transformados em arcsen $(x/100)^{1/2}$, conforme Franzin et al., (2012).

3.3.2. Avaliação do desenvolvimento inicial de alface a partir de sementes tratadas com células ou metabólitos do cultivo de *T. globosa*

Cinco dias após a germinação das sementes de alface, as plântulas foram transferidas para tubos Falcon contendo meio de cultura basal semi-sólido MS (Murashige e Skoog) marca Sigma®, com adição de 5 g.L⁻¹ de ágar, de forma a manter a parte aérea do lado de fora, e as raízes na parte interior, em contato com o meio de cultura. Os tubos foram tampados com Parafilm® com uma pequena abertura no centro, para a passagem da planta, na tentativa de manter a raiz sem contaminação de micro-organismos do ambiente (Figura 2).



Figura 2. Plantas após transplante para meio de cultura MS.

Foram utilizados 6 tubos por tratamento, sendo 1 planta/tubo. Os tubos foram mantidos em BOD com fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 25°C por 6 dias. Após este período foram realizadas as seguintes avaliações das plantas: área foliar, área e volume radicular e comprimento da raiz. Para a obtenção das medidas das plantas, as plantas foram retiradas cuidadosamente dos tubos e colocadas em bandeja com lâmina de água para que fosse realizada a digitalização das imagens das plantas em scanner (Epson®). A análise das imagens e obtenção das medidas foram realizadas através dos softwares WINRHIZO®, para raiz, e WINFOLIA®, para a parte aérea. Os softwares utilizados realizam medidas através das imagens escaneadas (Figura 03) e selecionadas como raiz ou parte aérea.

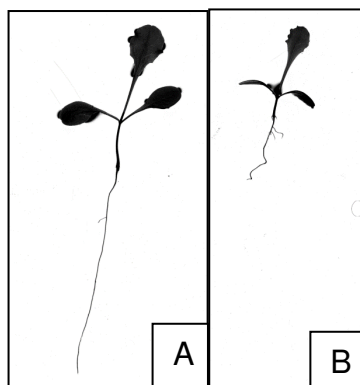


Figura 3. Imagens obtidas com scanner para plantas e posteriormente analisadas pelos softwares Winrhizo® e Winfolia®. (A) Tratamento 1, Cv. Valentina; (B) Tratamento 5, Cv. Valentina.

3.3.3. Avaliação do desenvolvimento de pelos radiculares nas plântulas de alface a partir de sementes tratadas com células ou metabólitos do cultivo de *T. globosa* sob microscópio

Sementes pré-germinadas e pré-tratadas conforme descrito no item 3.2, tiveram suas radículas alocadas em lâminas para microscopia, fixadas por lamínula, esta última espaçada da lâmina por miçangas de 2 mm de diâmetro, coladas com silicone. As radículas foram avaliadas em microscópio, na área próxima do meristema radicular. Foram avaliadas a presença (quantidade) e comprimento dos pelos radiculares, além de avaliação qualitativa (presença de pêlos radiculares retorcidos ou morfologicamente danificados), conforme o trabalho de Berggren et al. (2001).

3.4. Tratamento de sementes de alface (cv Valentina) com células e/ou metabólito do cultivo de *T. globosa*, e/ou com células de *Azospirillum brasilense*.

Para este ensaio foi utilizada a mesma metodologia para a produção dos compostos, descrita no item 3.2. Aos tratamentos, porém, foram adicionados dois novos, com a inoculação das sementes com células da bactéria diazotrófica *A. brasilense* isolada, e em associação com *T. globosa*.

O inóculo de *A. brasilense* foi preparado com as linhagens AbV5 e AbV6 (UFPR), do banco de culturas da Stoller do Brasil Ltda. O inóculo foi preparado a partir da multiplicação das células em meio de cultura NFb, em Erlenmeyer de 300 mL contendo 200 mL de meio de cultura, à 120 RPM, 30°C por 48h. A diluição feita foi semelhante à da levedura, utilizando uma diluição 1 em 100, e 100 µL por tubo.

Nesse ensaio, as sementes foram colocadas diretamente, sem pré-germinação, em tubos falcon de 50 mL contendo 30 mL de meio de cultivo MS semi-sólido (Figura 4). Foram colocadas 2 sementes por tubo, e após 5 dias, foi desbastada a planta menor. Após o plantio, foi realizado o tratamento através da pipetagem dos 100 µL de cada diluição dos compostos, de acordo com o tratamento, preparada previamente. O tubo foi fechado com Parafilm® para manter o ambiente estéril e manter a troca gasosa.

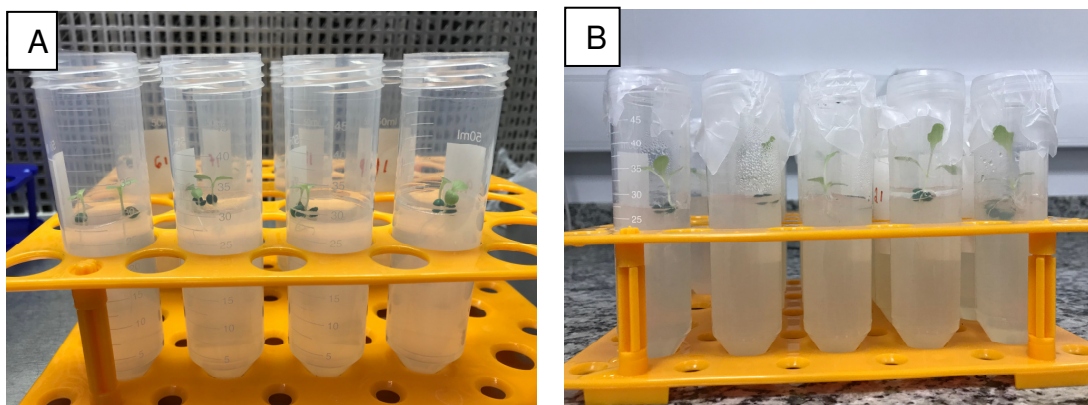


Figura 4. Plantas com germinação e desenvolvimento em meio MS em condições gnotobióticas (A) Cv. Valentina após 5 dias de semeadura, antes do desbaste (B). Planta no dia da avaliação.

Os tratamentos utilizados foram seguidos conforme a tabela 2.

Tabela 2. Tratamentos utilizados nos ensaios de crescimento inicial de alface com levedura, metabólitos e *Azospirillum brasilense*.

	Tratamentos	Meio de cultura	AIA (μg)/planta	Levedura (UFC)/planta
1	Testemunha	Solução Fisiológica	0	0
2	Levedura + Metabólito	Caldo Batata	$4,00 \times 10^{-5}$	1×10^5
3	Levedura	Caldo Batata	0	1×10^5
4	Metabólito	Caldo Batata	$4,00 \times 10^{-5}$	0
5	Levedura + Metabólito	Caldo Batata + 1g/L triptofano	$6,60 \times 10^{-4}$	1×10^5
6	Levedura	Caldo Batata + 1g/L triptofano	0	1×10^5
7	Metabólito	Caldo Batata + 1g/L triptofano	$6,60 \times 10^{-4}$	0
8	<i>A. brasilense</i>	NFb	0	1×10^5 (bactéria)
9	<i>A. brasilense</i> + Levedura	NFb/ Caldo Batata	$4,00 \times 10^{-5}$	1×10^5 (bactéria) + 1×10^5 (levedura)

Foram utilizados 6 tubos por tratamento, sendo 1 planta/tubo. Os tubos foram mantidos em BOD com fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 25 °C por 10 dias. Após esse período as plantas foram análises quanto às medidas de área foliar, volume, diâmetro, área e comprimento de raiz, e número de pontas de raízes, conforme descrito no item 3.3.2.

3.5. Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de LSD de Fisher a 5% de significância. As análises foram realizadas utilizando o software *Statística V.7*.

4. Resultados

4.1. Avaliação da germinação das sementes de alface tratadas com células ou metabólitos do cultivo de *T. globosa*

As sementes da cultivar Crocantela apresentaram 100% de germinação após 3 dias de tratamento, não sendo possível verificar diferença entre os tratamentos. Para a cultivar Valentina os resultados de germinação podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3. Porcentagem de germinação e índice de velocidade de germinação de sementes de alface da cultivar Valentina.

Inoculação Levedura	Aplicação Metabólito	Adição de Triptofano	Germinação (%)		IVG
			4 dias	7 dias	
NÃO	NÃO	NÃO	96,00	97,33	1,035
NÃO	SIM	NÃO	85,33	100,00	0,982
NÃO	SIM	SIM	82,67	92,00	0,927
SIM	NÃO	NÃO	76,00	89,33	0,860
SIM	NÃO	SIM	81,33	96,00	0,941
SIM	SIM	NÃO	69,33	94,67	0,838
SIM	SIM	SIM	84,00	92,00	0,934

Os resultados apresentados mostram que, apesar de não haver diferença estatística entre os tratamentos, a inoculação da levedura nas sementes promoveu uma porcentagem de germinação inferior se comparado às sementes não inoculadas. Enquanto que o tratamento controle alcançou 96% de germinação em 4 dias, o tratamento com inoculação da levedura manteve a taxa de germinação em 76% no mesmo período. Ao fim de 7 dias, porém, o tratamento das sementes com o metabólito da levedura proporcionou 100% de germinação das sementes, enquanto que a inoculação da levedura nas sementes fez com que a germinação não ultrapassasse 89%, uma queda de mais de 10%.

4.2. Avaliação do desenvolvimento inicial de alface a partir de sementes tratadas com células ou metabólitos do cultivo de *T. globosa*

Os resultados obtidos mostram que a cultivar Crocantela não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos para as variáveis área foliar, volume de raiz e número de pontas de raiz, apresentados nas Figuras 5, 6 e 7, respectivamente.

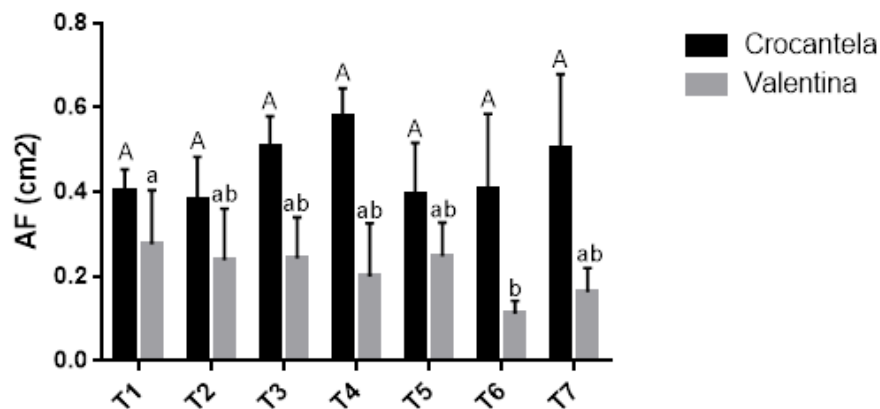


Figura 5. Área Foliar (AF). T1- Tratamento Controle; T2 (+) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano; T3 (+) Levedura (-) Metabólito (-) Triptofano; T4 (-) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano; T5 (+) Levedura (+) Metabólito (+) Triptofano; T6 (+) Levedura (-) Metabólito (+) Triptofano; T7 (-) Levedura (+) Metabólito (+) Triptofano. Letras maiúsculas representam comparações entre tratamentos da cv. Crocantela e letras minúsculas, comparações entre tratamentos da cv. Valentina.

É possível observar que, apesar dos valores médios observados diferirem entre os tratamentos, o desvio padrão é relativamente alto, o que impede a diferenciação estatística das médias apresentadas. É possível observar, por exemplo, que para a variável área foliar, os tratamentos 3, 4 e 7 parecem se destacar dos outros, com valores médios superiores. Para as variáveis volume de raiz e número de pontas de raízes, o tratamento 2 apresenta valor médio inferior aos outros tratamentos. Nos dois casos, porém, não é observada diferença significativa entre eles.

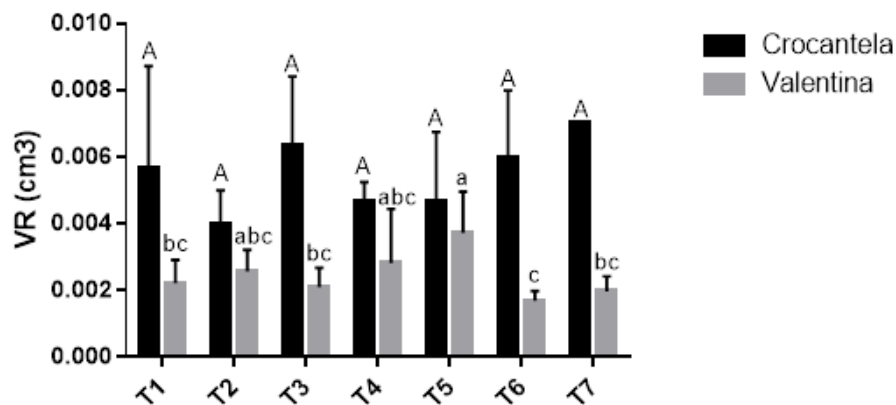


Figura 6. Volume de Raiz (VR). T1- Tratamento Controle; T2 (+) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano; T3 (+) Levedura (-) Metabólito (-) Triptofano; T4 (-) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano; T5 (+) Levedura (+) Metabólito (+) Triptofano; T6 (+) Levedura (-) Metabólito (+) Triptofano; T7 (-) Levedura (+) Metabólito (+) Triptofano. Letras maiúsculas representam comparações entre tratamentos da cv. Crocantela e letras minúsculas, comparações entre tratamentos da cv. Valentina.

Para a variável diâmetro de raiz foi observada diferença significativa entre o tratamento 7 (metabólito e triptofano) e o tratamento controle (T1) (Figura 8).

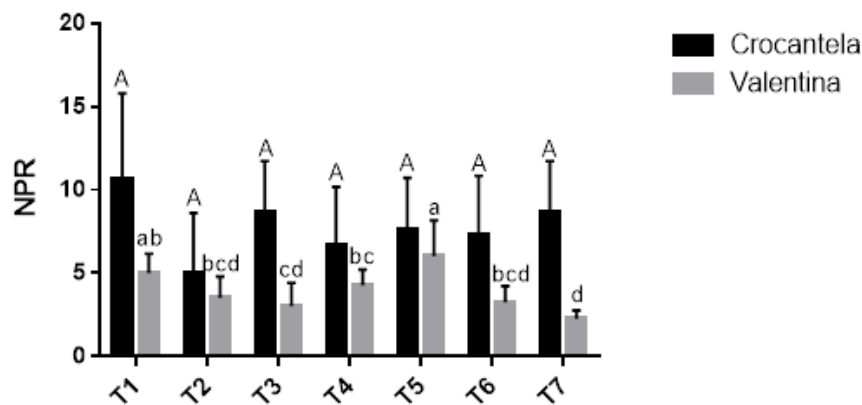


Figura 7. Número de Pontas de Raiz (NPZ). T1- Tratamento Controle; T2 (+) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano; T3 (+) Levedura (-) Metabólito (-) Triptofano; T4 (-) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano; T5 (+) Levedura (+) Metabólito (+) Triptofano; T6 (+) Levedura (-) Metabólito (+) Triptofano; T7 (-) Levedura (+) Metabólito (+) Triptofano. Letras maiúsculas representam comparações entre tratamentos da cv. Crocantela e letras minúsculas, comparações entre tratamentos da cv. Valentina.

Em relação à variável área da raiz (Figura 9), foi observada diferença significativa, entre o tratamento T1 e o T2 (levedura + metabólito), com resultados

superiores observados nas plantas controle. Mesmo resultado foi observado para a variável comprimento de raiz (Figura 10), com efeito significativamente negativo observado também para o T5 (levedura + metabólico + triptofano).

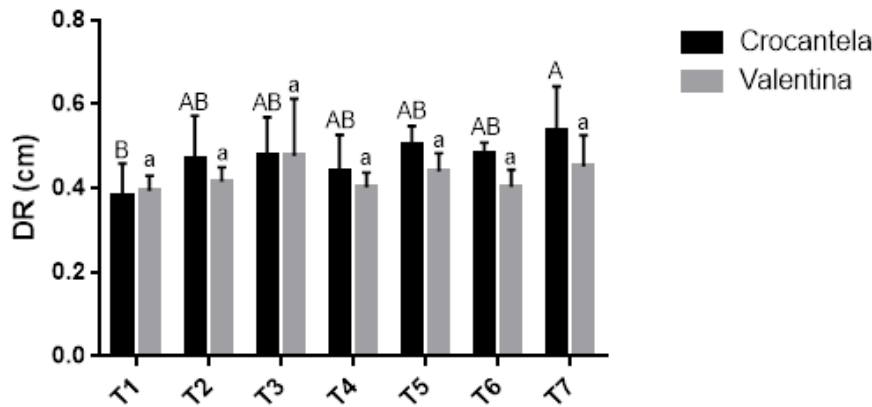


Figura 8. Diâmetro de Raiz (DR). T1- Tratamento Controle; T2 (+) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano; T3 (+) Levedura (-) Metabólito (-) Triptofano; T4 (-) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano; T5 (+) Levedura (+) Metabólito (+) Triptofano; T6 (+) Levedura (-) Metabólito (+) Triptofano; T7 (-) Levedura (+) Metabólito (+) Triptofano. Letras maiúsculas representam comparações entre tratamentos da cv. Crocantela e letras minúsculas, comparações entre tratamentos da cv. Valentina.

Para a cultivar Valentina, os resultados obtidos para área foliar (Figura 5) mostram que houve diferença entre as plantas do tratamento T1 e T6 (levedura e triptofano), sendo que as plantas tratadas foram afetadas de forma negativa.

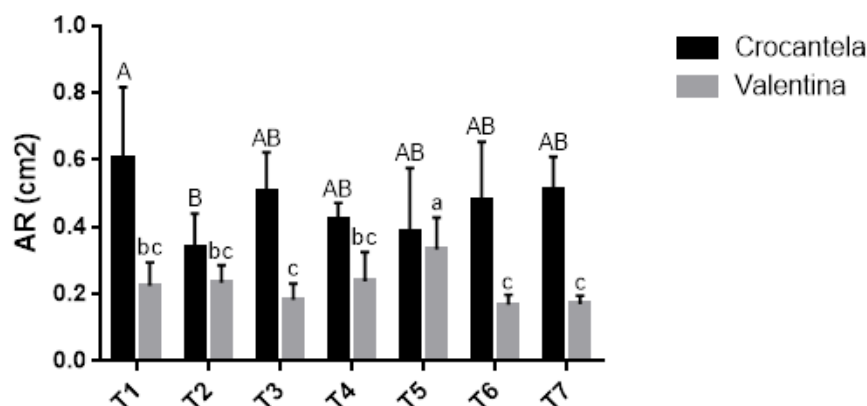


Figura 9. Área de Raiz (AR). T1- Tratamento Controle; T2 (+) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano; T3 (+) Levedura (-) Metabólito (-) Triptofano; T4 (-) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano; T5 (+) Levedura (+) Metabólito (+) Triptofano; T6 (+) Levedura (-) Metabólito (+) Triptofano; T7 (-) Levedura (+) Metabólito (+) Triptofano. Letras maiúsculas representam comparações entre tratamentos da cv. Crocantela e letras minúsculas, comparações entre tratamentos da cv. Valentina.

Quando avaliado o parâmetro volume da raiz (Figura 6), porém, o tratamento 5, composto pela levedura, metabólito e triptofano, se destaca, diferindo significativamente do controle (T1).

Para a variável número de pontas de raiz (Figura 7), o tratamento 5 também se destaca com os melhores resultados, porém não difere do T1. Para esta variável o tratamento 7 (metabólico + tritofano) apresenta efeito negativo.

Em relação ao parâmetro diâmetro de raiz (Figura 8), não houve diferença entre os tratamentos. Quando avaliado em relação à área da raiz (Figura 9), porém, o tratamento 5 novamente se destaca de todos os outros tratamentos, diferindo estatisticamente dos demais.

Para o parâmetro comprimento da raiz, na Figura 10, os tratamentos 4 e 5 não diferem da testemunha. Os demais tratamentos são inferiores estatisticamente.

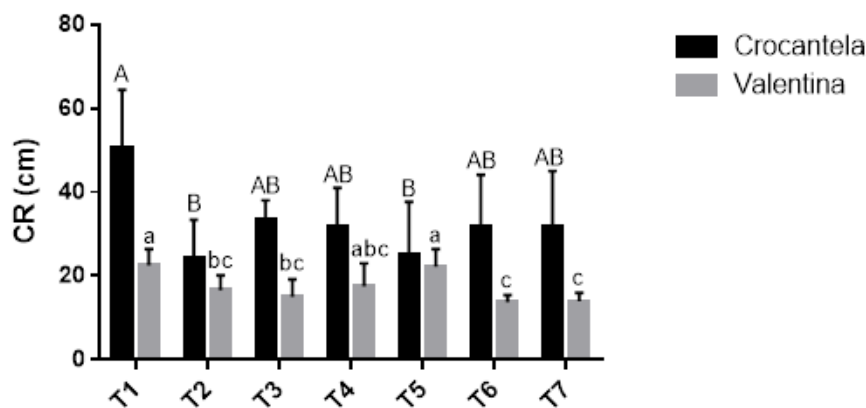


Figura 10. Comprimento de Raiz (CR). T1- Tratamento Controle; T2 (+) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano; T3 (+) Levedura (-) Metabólito (-) Triptofano; T4 (-) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano; T5 (+) Levedura (+) Metabólito (+) Triptofano; T6 (+) Levedura (-) Metabólito (+) Triptofano; T7 (-) Levedura (+) Metabólito (+) Triptofano. Letras maiúsculas representam comparações entre tratamentos da cv. Crocantela e letras minúsculas, comparações entre tratamentos da cv. Valentina.

4.3. Avaliação do desenvolvimento de pelos radiculares sob microscópio de plântulas de alface a partir de sementes tratadas com células e/ou metabólitos do cultivo de *T. globosa*

A partir das observações realizadas nas raízes das plantas sob microscópio óptico, foi possível observar que para a cultivar Crocantela os tratamentos T3 e T4 foram os que apresentaram melhores resultados nos quesitos quantidade e tamanho de pelos radiculares (Figura 11). O comprimento máximo dos pelos radiculares observado no tratamento 3 foi de 0,294 mm, enquanto que o tratamento 4 foi o que apresentou o maior valor, de 0,496 mm. Apesar de não ser possível realizar a contagem do número de pelos presentes nas radículas, os tratamentos T3 e T4 apresentam, visualmente, quantidade superior de pelos, o que pode ser conferido na Figura 11. É possível observar que o tratamento controle (T1) apresenta menor quantidade e tamanho de pelos, se comparado aos outros tratamentos.

Para a cultivar Valentina, porém, os melhores resultados obtidos foram para os tratamentos T5 e T7 (Figura 12). O melhor resultado quanto ao comprimento máximo dos pelos radiculares foi obtido no tratamento 5, de 0,500 mm, enquanto que para o tratamento 7 o valor máximo foi de 0,273 mm. Para a cultivar Valentina, diferente da Crocante, o tratamento controle (T1) não foi o que apresentou menor quantidade e menores pelos. Visualmente, o T1 fica apenas atrás dos tratamentos 5 e 7, apresentando comprimento máximo de pelo de 0,234 mm. Os tratamentos 2, 4 e 6 foram os que apresentaram resultados inferiores, sendo estes possíveis de serem observados na Figura 12.

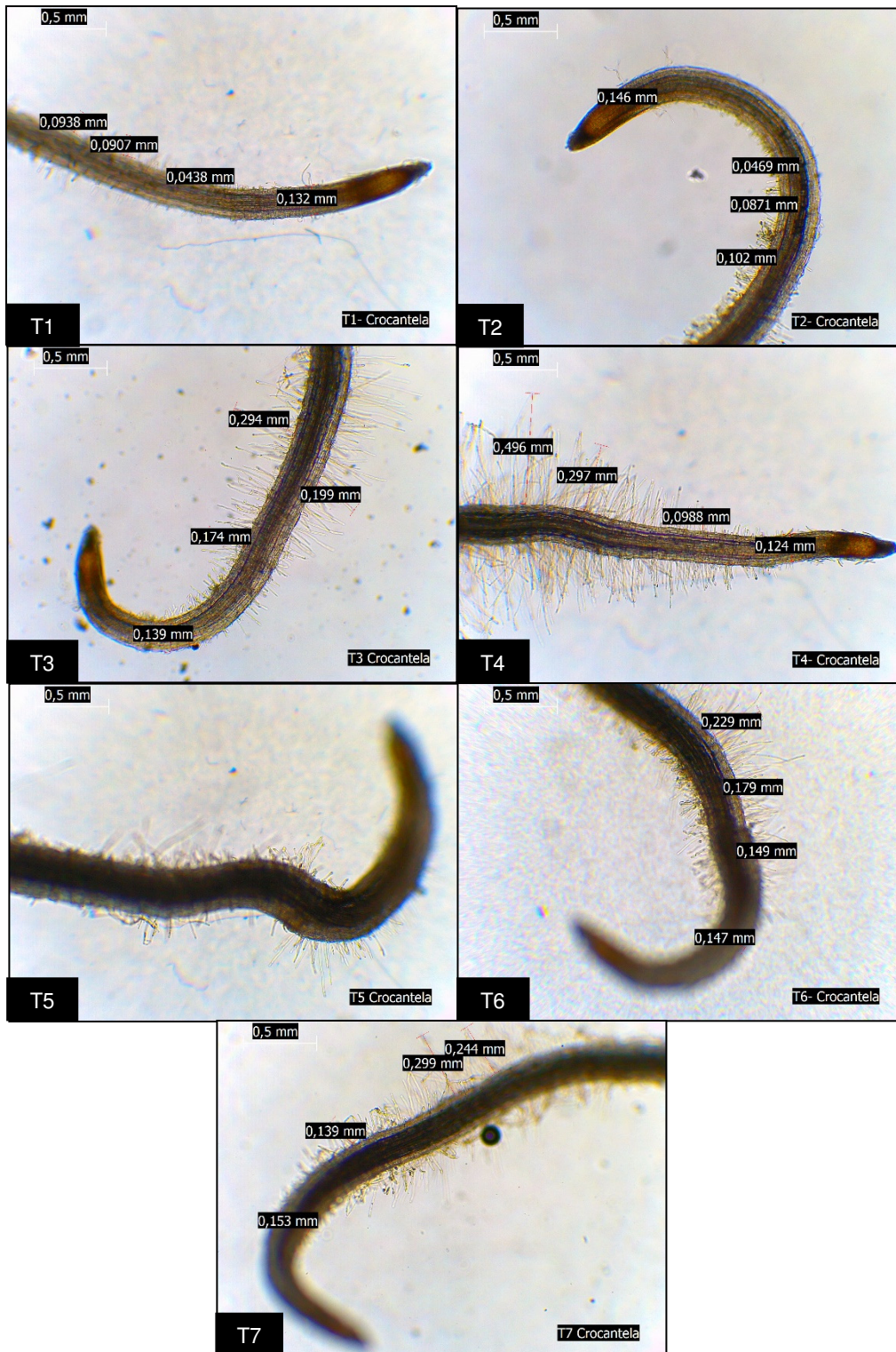


Figura 17. Meristema radicular e pêlos radiculares de plântulas de alface da cultivar Crocantela. T1- Tratamento Controle; T2 (+) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano; T3 (+) Levedura (-) Metabólito (-) Triptofano; T4 (-) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano; T5 (+) Levedura (+) Metabólito (+) Triptofano; T6 (+) Levedura (-)

Metabólito (+) Triptofano; T7 (-) Levedura (+) Metabólito (+) Triptofano. Foto obtida de microscópio óptico.

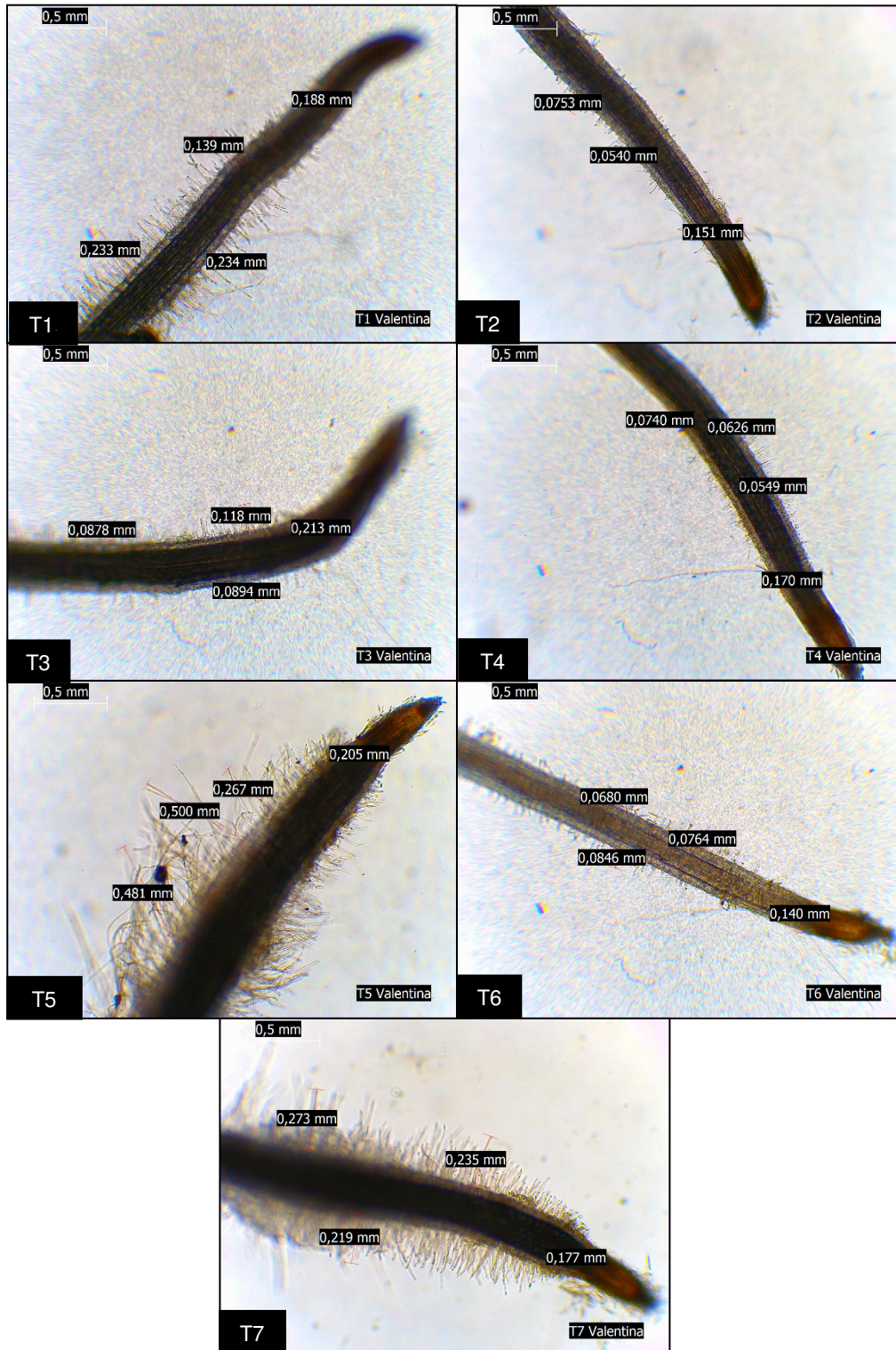


Figura 12. Meristema radicular e pêlos radiculares de plântulas de alfaca da cultivar Valentina. T1- Tratamento Controle; T2 (+) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano; T3

(+) Levedura (-) Metabólito (-) Triptofano; T4 (-) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano; T5 (+) Levedura (+) Metabólito (+) Triptofano; T6 (+) Levedura (-) Metabólito (+) Triptofano; T7 (-) Levedura (+) Metabólito (+) Triptofano. Foto obtida de microscópio óptico.

4.4. Tratamento de sementes de alface (cv Valentina) com células e/ou metabólito do cultivo de *T. globosa*, e/ou com células de *Azospirillum brasilense*.

Em relação à área foliar (Figura 13), todos os tratamentos diferiram negativamente em relação à testemunha.

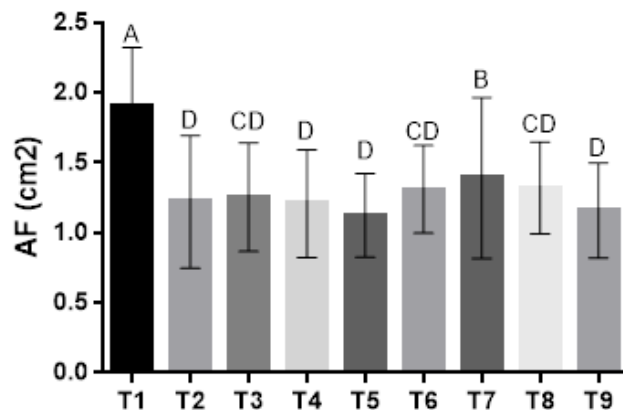


Figura 13. Área foliar (AF) / Cultivar Valentina. T1- Tratamento Controle; T2 (+) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano; T3 (+) Levedura (-) Metabólito (-) Triptofano; T4 (-) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano; T5 (+) Levedura (+) Metabólito (+) Triptofano; T6 (+) Levedura (-) Metabólito (+) Triptofano; T7 (-) Levedura (+) Metabólito (+) Triptofano; T8 (-) Levedura (-) Metabólito (-) Triptofano (+) Cultivo *Azospirillum*; T9 (+) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano (+) Cultivo *Azospirillum*.

Quando avaliado o volume da raiz (Figura 14), nenhum dos tratamentos diferem estatisticamente da testemunha, porém os tratamentos 5 e 7 apresentam diferença significativa dos tratamentos 2 e 4, mostrando que a adição do triptofano, influenciou no volume final da raiz.

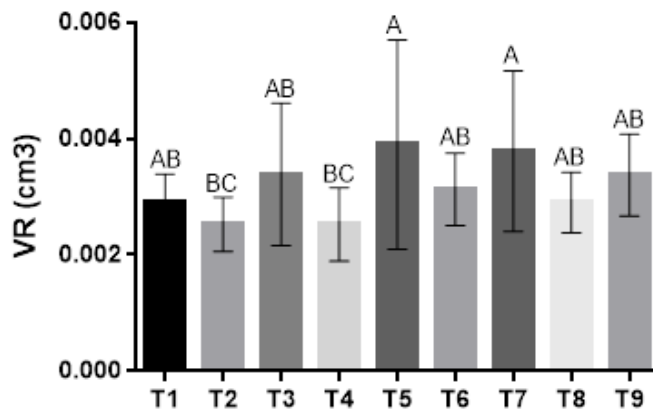


Figura 14. Volume de raiz (VR) / Cultivar Valentina. T1- Tratamento Controle; T2 (+) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano; T3 (+) Levedura (-) Metabólito (-) Triptofano; T4 (-) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano; T5 (+) Levedura (+) Metabólito (+) Triptofano; T6 (+) Levedura (-) Metabólito (+) Triptofano; T7 (-) Levedura (+) Metabólito (+) Triptofano; T8 (-) Levedura (-) Metabólito (-) Triptofano (+) Cultivo *Azospirillum*; T9 (+) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano (+) Cultivo *Azospirillum*.

O parâmetro número de pontas de raiz (Figura 15), nos mostra que, numericamente, o tratamento controle apresentou os menores valores. Porém, apenas o tratamento 7 diferiu estatisticamente da testemunha, apresentando valores superiores. O tratamento 7 apenas não diferiu estatisticamente do tratamento 5, levedura, metabólito e triptofano, e tratamento 9, cultivo de *Azospirillum* + (T2-levedura e metabólito).

O diâmetro da raiz, na Figura 16, apresentou resultados significativamente superiores em relação à testemunha no tratamento 5 e no tratamento 7. O tratamento 5 foi superior também aos demais tratamentos, e o tratamento 7 foi superior aos tratamentos que não continham triptofano ou *Azospirillum*.

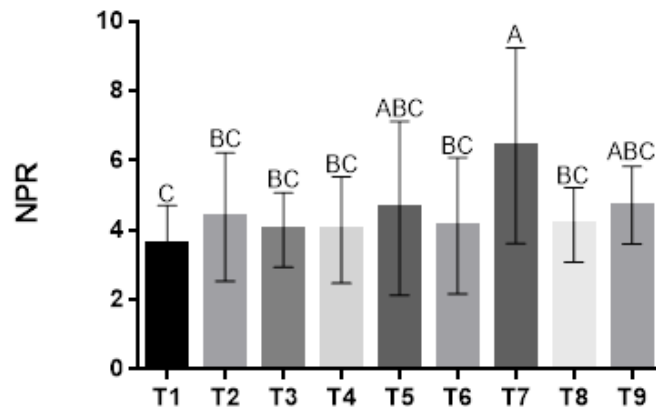


Figura 15. Número de pontas de raiz (DPR) / Cultivar Valentina. T1- Tratamento Controle; T2 (+) Levedura (+) Metabólito (-) Tryptofano; T3 (+) Levedura (-) Metabólito (-) Tryptofano; T4 (-) Levedura (+) Metabólito (-) Tryptofano; T5 (+) Levedura (+) Metabólito (+) Tryptofano; T6 (+) Levedura (-) Metabólito (+) Tryptofano; T7 (-) Levedura (+) Metabólito (+) Tryptofano; T8 (-) Levedura (-) Metabólito (-) Tryptofano (+) Cultivo *Azospirillum*; T9 (+) Levedura (+) Metabólito (-) Tryptofano (+) Cultivo *Azospirillum*.

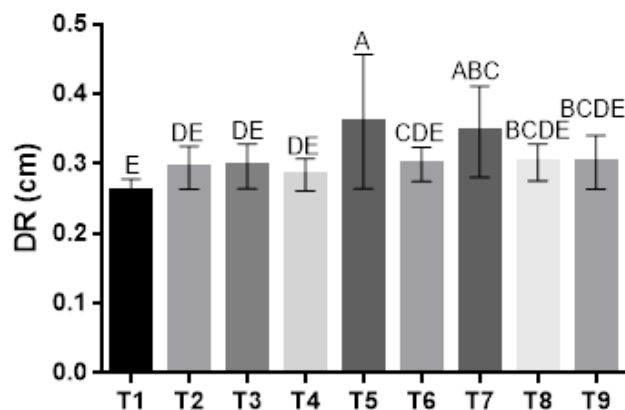


Figura 16. Diâmetro da raiz (DR) / Cultivar Valentina. T1- Tratamento Controle; T2 (+) Levedura (+) Metabólito (-) Tryptofano; T3 (+) Levedura (-) Metabólito (-) Tryptofano; T4 (-) Levedura (+) Metabólito (-) Tryptofano; T5 (+) Levedura (+) Metabólito (+) Tryptofano; T6 (+) Levedura (-) Metabólito (+) Tryptofano; T7 (-) Levedura (+) Metabólito (+) Tryptofano; T8 (-) Levedura (-) Metabólito (-) Tryptofano (+) Cultivo *Azospirillum*; T9 (+) Levedura (+) Metabólito (-) Tryptofano (+) Cultivo *Azospirillum*.

Em relação à área da raiz (Figura 17), o tratamento 2 diferiu negativamente em relação à testemunha, enquanto os demais tratamentos não apresentaram diferenças.

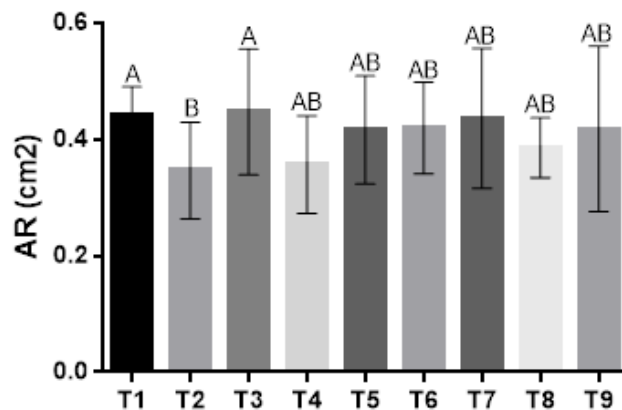


Figura 17. Área da raiz (AR) / Cultivar Valentina. T1- Tratamento Controle; T2 (+) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano; T3 (+) Levedura (-) Metabólito (-) Triptofano; T4 (-) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano; T5 (+) Levedura (+) Metabólito (+) Triptofano; T6 (+) Levedura (-) Metabólito (+) Triptofano; T7 (-) Levedura (+) Metabólito (+) Triptofano; T8 (-) Levedura (-) Metabólito (-) Triptofano (+) Cultivo *Azospirillum*; T9 (+) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano (+) Cultivo *Azospirillum*.

O parâmetro comprimento da raiz, observado na Figura 18, apresentou diversos tratamentos com reduções significativas em relação à testemunha, como o tratamento 2, 4, 5, 7 e 8.

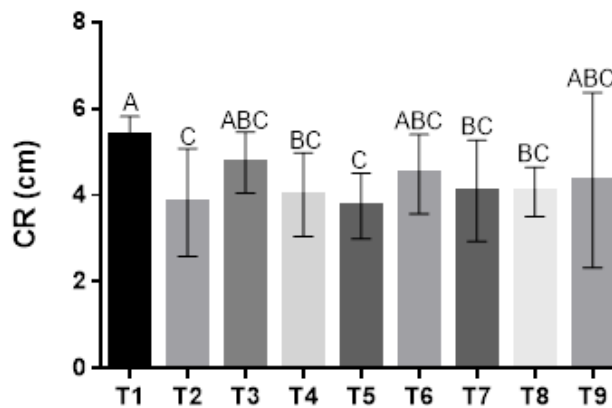


Figura 18. Comprimento da raiz (CR) / Cultivar Valentina. T1- Tratamento Controle; T2 (+) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano; T3 (+) Levedura (-) Metabólito (-) Triptofano; T4 (-) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano; T5 (+) Levedura (+) Metabólito (+) Triptofano; T6 (+) Levedura (-) Metabólito (+) Triptofano; T7 (-) Levedura (+) Metabólito (+) Triptofano; T8 (-) Levedura (-) Metabólito (-) Triptofano (+) Cultivo *Azospirillum*; T9 (+) Levedura (+) Metabólito (-) Triptofano (+) Cultivo *Azospirillum*.

5. Discussão

No presente trabalho, a levedura rizosférica *T. globosa*, que apresenta potencial para promoção de crescimento vegetal, foi avaliada quanto sua ação na germinação e desenvolvimento inicial de duas cultivares de alface, em condições de laboratório. Ensaio com plantas em condições gnotobióticas podem ser úteis quanto a observação da ação isolada do micro-organismo inoculado, e na avaliação deste como pretense promotor de crescimento vegetal (AMBREETHA et al, 2018). Os dados obtidos, porém, não representam a realidade de quando o processo se estabelece no campo, na presença de outros micro-organismos e sem o controle das condições ambientais impostas.

Além da ação das células de levedura na planta, neste trabalho também foi avaliada a ação de seus metabólitos (filtrado do cultivo da levedura por 48 horas na presença de triptofano). A produção de AIA pela levedura *T. globosa* (5S55) foi anteriormente avaliada por Oliveira (2016), que observou produção máxima de 835 µg/mL, após 24 horas de incubação, com queda desta brusca desta concentração no meio após este período. Considerando a alta produção de AIA previamente observada por *T. globosa*, neste trabalho foi considerada 48 horas de cultivo para a obtenção do metabólito, e a concentração de AIA utilizada nos ensaios foi de 66 µg/mL (após diluição de 10 vezes do meio original). Considerando que a levedura *T. globosa* produz AIA apenas na presença de triptofano como precursor, a adição deste aminoácido também foi considerada nos tratamentos.

Foram observadas diferentes respostas para as diferentes cultivares de alface testadas. As diferenças podem ser observadas desde a germinação. A cultivar Crocantela apresentou maior velocidade de germinação, fato que impediu até mesmo o cálculo do IVG (índice de velocidade de germinação), sendo que 3 dias após semeada, 100% das sementes estavam germinadas. As sementes da cultivar Valentina, por sua vez, alcançaram 100% de germinação após 7 dias de semeadura, e apesar de não haver diferença estatística entre os tratamentos, foi possível observar que a inoculação da levedura nas sementes proporcionou um prejuízo de 10% na taxa de germinação. Resultados similares foram observados por Nakayan et al. (2013), que avaliou a ação de leveduras na germinação de milho e repolho chinês; os autores observaram que a germinação de milho não foi afetada pela inoculação, enquanto que as sementes de repolho inoculadas com a levedura

Rhodotorula mucilaginosa apresentou queda de 42% na taxa de germinação; para o milho, apesar da inoculação das sementes com as leveduras não afetar significativamente a germinação, proporcionou aumento significativo do tamanho das plantas, tanto da parte aérea como da raiz.

Neste trabalho foi possível observar que, para a cultivar Crocantela, a raiz foi a parte da planta mais afetada pela inoculação das sementes; quando as sementes foram tratadas com o metabólito da levedura e o triptofano foi adicionado, as raízes apresentaram maior diâmetro. Nos tratamentos que apresentaram células e metabólitos da levedura, porém, as plantas apresentaram raízes com menor área e comprimento. Esses resultados são semelhantes aos observados nas mudas da cultivar Crocantela apresentados no Capítulo 1, isto é, raízes menores e mais densas. Provavelmente como resultado da ação da levedura e seus metabólitos, com aumento da presença de AIA na raiz das plantas. Se a concentração de auxina é baixa na raiz, pode estimular a alongação da raiz primária, porém, se a concentração for alta, promoverá formação de raiz secundária, pelos radiculares e inibição do crescimento da raiz primária (AMBREETHA et al., 2018, PATTEN e GLICK, 2002), o que pode explicar a maioria dos resultados de comprimento radicular serem inferiores à testemunha (TAIZ e ZEIGER, 2009).

Mesmo resultado foi obtido por Sun et al. (2014), que avaliou a ação da levedura *Ustilago esculenta* no desenvolvimento de raízes de *Arabidopsis in vitro*, e observou que a produção de AIA pela levedura causou aumento de raízes laterais e inibição de raízes primárias. Podemos observar, que a maior presença de pelos radiculares em plântulas de alface Crocantela desenvolvidas a partir de sementes tratadas (com levedura ou seu metabólito com AIA), pode apresentar mesma explicação. É possível, porém, encontrar outros trabalhos na literatura com resultados diferentes, em que a inoculação da levedura, promove aumento do comprimento tanto da parte aérea como da raiz (AMPRAYN et al., 2012; NAKAYAN et al., 2013; NASSAR et al., 2005). Produção de AIA pode não ser o único mecanismo utilizado por leveduras para a promoção de crescimento vegetal. O controle de fitopatógenos ou micro-organismos deletérios (ALLOUI et al., 2015), estímulo à colonização de fungos micorrízicos (SARABIA et al., 2017), ou disponibilização de nutrientes (FU et al., 2016) são outros mecanismos que foram relatados à diferentes espécies de levedura.

Para as plantas de alface da cultivar Valentina os resultados mostraram que para a variável área foliar o tratamento controle apresentou-se estatisticamente superior ao tratamento das sementes com levedura e triptofano. Apesar disso, para os parâmetros relativos à raiz, foi observado que o tratamento 5 (inoculação da levedura, seus metabólitos e adição de triptofano) foi superior ao tratamento controle tanto para volume como para área de raiz. É possível observar que a presença de pelos radiculares em plântulas do tratamento 5 também se destaca, tanto em número como em tamanho.

Fu et al. (2016) avaliou variações ocorridas no tecido radicular de plantas inoculadas com a levedura *Ustilago esculenta*, e observou que a presença da levedura produtora de AIA na raiz promove alteração na arquitetura radicular de *Nicotiana benthamiana*, através do aumento da atividade mitótica e proliferação de células radiculares. Idris et al. (2007), verificaram promoção de crescimento vegetal em plantas de *Lemna minor* com aplicação de filtrado de *Bacillus amyloliquefaciens*, com e sem células, e observou um aumento da promoção do crescimento vegetal quando havia células presentes. Ambreetha et al. (2018) observaram que, aplicando *Bacillus altitudinis* em sementes de alface, a arquitetura da raiz era alterada, aumentando o número de raízes secundárias, diâmetro da raiz e diminuindo o comprimento da raiz principal, resultados muito semelhantes aos vistos em nossos experimentos com alface. A aplicação de *Azospirillum brasilense*, bactéria produtora de auxina, também alterou a arquitetura da raiz, promovendo a produção de pelos radiculares (DOBBELAERE et al., 1999).

É possível observar também que, para a cultivar Valentina, os tratamentos com adição de triptofano (com levedura ou metabólito) promoveu prejuízo nas variáveis área e comprimento de raiz. A presença do aminoácido pode promover aumento da concentração de AIA, o que pode explicar os resultados. Nassar et al. (2005) avaliou a ação de duas leveduras endofíticas, *Williopsis saturnus* (produtora de AIA) e *Rhodotorula glutinis* (não produtora de AIA), na presença e ausência de triptofano, na promoção de crescimento de milho; a adição de triptofano afetou de forma significativa o desenvolvimento da planta e promoveu aumento da concentração endógena de AIA nas raízes e parte aérea de plântulas, mesmo sem a presença da levedura. A alface parece ser sensível a altas concentrações de AIA; apesar do hormônio estimular o desenvolvimento vegetal, em altas concentrações o efeito pode ser inverso, e causar danos. Schlindwein et al. (2008) avaliou a

inoculação de *Bradyrhizobium* sp. (TV-13) e adição de triptofano em sementes de alface; os autores observaram que a linhagem apresenta alta produção de AIA na presença de triptofano (*in vitro*), o que provavelmente foi responsável pelos problemas observados no desenvolvimento, tanto da raiz como da parte aérea das plântulas.

É importante destacar que, apesar dos resultados obtidos *in vitro*, da capacidade de *T. globosa* em produzir AIA (NUTARATAT et al., 2014; OLIVEIRA, 2016; FU et al., 2016), este mecanismo pode não ser expresso nas condições *in vivo*; é importante considerar que as condições estressantes que o micro-organismo encontra no ambiente radicular podem prejudicar a produção de AIA, como baixa concentração de nutrientes, variações de pH, competição com outros micro-organismos rizosféricos (ODOH, 2017). Albertini (2017) observou, em ensaios *in vitro*, que a espécie *Torulaspota globosa* (linhagem 6S01) isolada de rizosfera de milho, produz altas quantidades de AIA na ausência de fontes de nitrogênio no meio, e que o pH alcalino favorece a produção de forma significativa. Scarcella et al (2017) estudando a produção de AIA pelas espécies de levedura *Trichosporon asahii* e *Rhodotorula mucilaginosa in vitro* observaram que variações da temperatura, pH e fontes de carbono afetam drasticamente a produção do fitohormônio.

As sementes de alface da cultivar Valentina também foram avaliadas quanto a inoculação com *Azospirillum brasilense*, bactéria diazotrófica conhecida por promover crescimento vegetal de diferentes culturas; a dupla inoculação da bactéria com a levedura *T. globosa* também foi avaliada. Os resultados obtidos mostraram que a inoculação da bactéria (isolada ou com a levedura) não promoveu de forma significativa o crescimento das plântulas de alface. Estudos com a inoculação de sementes e mudas de alface com bactérias diazotróficas podem ser encontrados na literatura, principalmente com espécies do gênero *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* (SCHLINDWEIN et al., 2008; KOZUSNY-ANDREAN; ANDREANI JUNIOR, 2014). Para ambos os gêneros, nos dois trabalhos citados, os autores observaram que a inoculação com as bactérias promoveu crescimento significativo das plantas de alface. Como as cultivares avaliadas foram diferentes das testadas neste trabalho, os resultados podem variar, como mostrado nos ensaios de comparação entre as cultivares Crocantela e Valentina.

6. Conclusões

Considerando os resultados obtidos é possível concluir que:

- a inoculação das sementes de alface com a levedura rizosférica *T. globosa* e/ou seus metabólitos não afetou a germinação de alface das cultivares Crocantela e Valentina;

- plântulas da cultivar Crocantela apresentaram raízes menores e com menor área quando tratadas com a levedura e seus metabólitos; o tratamento com os metabólitos e triptofano, por sua vez proporcionou maior diâmetro de raiz;

- para a cultivar Valentina o tratamento com a levedura, seus metabólitos e adição de triptofano foi o que proporcionou os melhores resultados, com destaque para as variáveis volume e área de raiz, número de pontas de raízes e desenvolvimento de pelos radiculares;

- a inoculação da bactéria *A. brasilense*, isolada e em co-inoculação com a levedura, não promoveu crescimento significativo das plantas de alface da cultivar Valentina.

7. Literatura citada

ALBERTINI, J. Produção de ácido indol acético in vitro por *Torulaspora globosa*. 55p. **Dissertação (Mestrado)**- Universidade Federal de São Carlos, 2017.

ALOUJ, H.; LICCIARDELLO, F.; KHWALDIA, K.; HAMDI, M.; RESTUCCIA, C. Physical properties and antifungal activity of bioactive films containing *Wickerhamomyces anomalus* killer yeast and their application for preservation of oranges and control of postharvest green mold caused by *Penicillium digitatum*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 200, p. 22-30, 2015.

AMBREETHA, S.; CHINNAPPAN, C.; PONNUSAMY, M.; DANANJEYAN, B. Plant-associated *Bacillus modulates* the expression of auxin-responsive genes of rice and modifies the root architecture. **Rhizosphere**, v. 5, p. 57-66, 2018.

AMPRAYANA, K.; ROSEA, M.T.; KECSKÉS, M.; PEREG, L.; NGUYEND, H.T.; KENNEDY, I.R. Plant growth promoting characteristics of soil yeas (*Candida*

tropicalis HY) and its effectiveness for promoting rice growth. **Applied Soil Ecology**, v. 61, p. 295-299, 2012.

BERGGREN, I.; ALSTROM, S.; MARTENSSON, A.M. Deleterious properties of certain rhizosphere bacteria on field pea (*Pisum sativum*) under gnotobiotic and non-sterile conditions. **Applied Soil Ecology**, v.16, p.169-177, 2001.

BIZARRIA JUNIOR, R. Potencial de *Torulaspota globosa* e *Rhodotorula mucilaginosa* como agentes de controle biológico de *Alternaria alternata* em tomate. 41p. **Monografia (Graduação)**, Universidade Federal de São Carlos, 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399p.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGHES, A.; THYS, A.; BROEK, A.V.; VANDERLEYDEN, J. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutante strains altered in IAA production on wheat. **Plant and Soil**, v. 212, p. 155-164, 1999.

DODD, I.C.; ZINOVKINA, N.Y.; SAFRONOVA, V.I.; BELIMOV, A.A. Rhizobacterial mediation of plant hormone status. **Annals of Applied Biology**, v. 157, p. 361-379, 2010.

FU, S.F.; SUN, P.F.; LU, H.Y.; WEI, J.Y.; XIAO, H.S.; FANG, W.T.; CHEN, B.Y.; CHOU, J.Y. Plant growth-promoting traits of yeasts isolated from the phyllosphere and rhizosphere of *Drosera spatulata* Lab. **Fungal Biology**, v. 120, p. 433-448, 2016.

GLICKMANN, E.; DESSAUX, E. 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.

GOPALAKRISHNAN, S.; SRINIVAS, V.; SAMINENI, S. Nitrogen fixation, plant growth and yield enhancements by diazotrophic growth-promoting bacteria in two

cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, p. 116-123, 2017.

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.

KOZUSNY-ANDREANI, D.I.; ANDREANI-JUNIOR, R. Colonização rizosférica e promoção de crescimento por rizóbios em mudas de alface. **Nucleus**, v. 11, n. 2, p. 443-452, 2014.

LIU. Y.; CHEN. L.; ZHANG. N.; LI. Z.; ZHANG. G.; XU. Y.; SHEN. Q.; ZHANG. R. Plant-microbe communication enhances auxin biosynthesis by a root-associated bacterium. *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v.29. p.324-330. 2016.

LUDWIG-MÜLLER, J. Bacteria and fungi controlling plant growth by manipulating auxin: balance between development and defense. **Journal of Plant Physiology**, v. 172, p. 4-12, 2015.

MUSTAFA, A.; IMRAN, M.; ASHRAF, M.; MAHMOOD, K. Perspectives of using L-tryptophan for improving productivity of agricultural crops: a review. **Pedosphere**, v. 28, n. 1, p. 16-34, 2018.

NAKAYAN, P.; HAMEED, A.; SINGH, S.; YOUNG, L.; HUNG, M.; YOUNG, C. Phosphate-solubilizing soil yeast *Meyerozyma guilliermondii* CC1 improves maize (*Zea mays* L.) productivity and minimizes requisite chemical fertilization. **Plant and Soil**, v. 373, p. 301-315, 2013.

NASSAR, A.; EL-TARALIBY, K.; 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.

NUTARATAT, P.; SRISUK, N.; ARUNRATTIYAKORN, P.; LIMTONG, S. Plant growth-promoting traits of epiphytic and endophytic yeast isolated from rice and sugar cane leaves in Thailand. **Fungal Biology**, v. 118, p. 683-694, 2014.

ODOH, C.K. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a bioprotectant bioinoculant for sustainable agrobiolgy. A review. **International Journal of Advanced Research in Biological Sciences**. v. 4, p. 123-142, 2017.

OLIVEIRA, B.T. Leveduras produtoras de AIA e solubilizadoras de P visando a promoção de crescimento de tomateiro. 65p. **Dissertação (mestrado)**- Universidade Federal de São Carlos, 2016.

PATTEN, C.L.; CLICK, B.R. Role of *Pseudomonas putida* indolacetic acid in development of the host plant root system. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 8, p. 3795-3801, 2002.

PEREG, L.; MCMILLAN, M.; Scoping de potential uses of beneficial microorganisms for increasing productivity in cotton cropping systems. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 80, p. 349-358, 2015.

ROSA, M.M. Avaliação de leveduras isoladas de áreas agrícolas como agentes no controle biológico de fitopatógenos. 121f. **Tese (Doutorado)** – Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro. Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, 2009.

ROSA-MAGRI, M.M.; AVANSINI, S.H.; LOPES-ASSAD, M.L.; TAUK-TORNISIELO, S.M.; CECCATO-ANTONINI, S.R. Release of potassium from rock powder by the yeast *Torulaspora globosa*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, 2012.

SALA, F.C.; COSTA, C.P. Retrospectiva e tendência da alfacultura brasileira. **Horticultura Brasileira**, v. 30, p. 187-194, 2012.

SARABIA, M.; JAKOBSEN, I. GRONLUND, M.; CARREON-ABUD, C.; LARSEN, J. Rhizosphere yeast improve P uptake of a maize arbuscular mycorrhizal association. **Applied Soil Ecology**, v. 125, p. 18-25, 2018.

SCARCELLA, A.S.; BIZZARRIA JUNIOR, R.; BASTOS, R.G.; MAGRI, M.R. Temperature, pH and carbon source affect drastically indole acetic acid production of plant growth promoting yeasts. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 34, n. 2, p. 429-438, 2017.

SUAREZ, D.E.C.; GIGON, A.; PUGA-FREITAS, R.; LAVELLE, P.; VELASQUEZ, E.; BLOUIN, M. Combined effects of earthworms and IAA-producing rhizobacteria on plant growth and development. **Applied Soil Ecology**, v. 80, p.100-107, 2014.

SUN, Y. GUO, J.; LIU, F.; LIU, Y. Identification of indigenous yeast flora isolated from the five winegrape varieties harvested in Xiangning, China. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 105, p. 533-540, 2014.

SCHLINDWEIN, G.; VARGAS, L.K.; LISBOA, B.B.; AZAMBUJA, A.C. Influência da inoculação de rizóbios sobre a germinação e o vigor de plântulas de alface. **Ciência Rural**, v. 38, n. 3, p. 658-664, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. Artmed Editora. 848p. 2009.

ZIECH, A.R.D.; CONCEIÇÃO, P.C.; LUCHESE, A.V.; PAULUS, D.; ZIECH, M. Cultivo de alface em diferentes manejos de cobertura do solo e fontes de adubação. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, n. 9, p. 948-954, 2014.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O emprego de micro-organismos promotores de crescimento vegetal ainda é uma tecnologia raramente utilizada na agricultura brasileira. O empenho no desenvolvimento de técnicas que empreguem micro-organismos em parceria ou em substituição a insumos químicos, porém, é imperativa, considerando o uso intensivo do solo, e a escassez de recursos minerais utilizados como matéria-prima na produção de fertilizantes solúveis.

Dentre as principais dificuldades observadas para o estabelecimento desta tecnologia podemos citar, a descoberta de linhagens que apresentem mecanismos de promoção de crescimento, como produção de hormônios vegetais, disponibilização de nutrientes e controle de patógenos e deletérios; além disso, essas linhagens também precisam ser competentes para se estabelecer, após inoculadas, na raiz das plantas, ou colonizarem seus tecidos, e se estabelecer de forma endofítica. Por essa razão, as espécies microbianas mais utilizadas em inoculantes comerciais são muito resistentes (*Bacillus* que formam endósporo), muito agressivas (*Trichoderma*, que se multiplica com muita rapidez) ou colonizam o tecido radicular (bactérias diazotróficas simbióticas que formam nódulos em leguminosas).

Neste trabalho apresentamos um novo grupo microbiano, pouco considerado como promotor de crescimento vegetal, as leveduras. *Torulaspota globosa* é uma espécie pouco estudada, porém está sendo isolada de forma recorrente da rizosfera de cana-de-açúcar e milho, e se destaca quanto a apresentar os mecanismos acima descritos como presentes em um MPCV. Este trabalho apresenta resultados inéditos

da inoculação desta levedura (linhagem 5S55) em sementes e mudas de alface, das cultivares Crocantela e Valentina. Os ensaios foram realizados tanto em condições gnotobióticas, como em condições de casa-de-vegetação e campo.

Os resultados mostraram que a levedura foi capaz de promover o crescimento do alface, em todas as condições avaliadas, estimulando o desenvolvimento radicular, aumentando a superfície de absorção da planta, e provavelmente, desta forma, estimulando seu desenvolvimento foliar, e aumentando a produção da planta no campo. Estudos mais detalhados, e o desenvolvimento de formulações, que possam proteger as células, e estimular seu estabelecimento na rizosfera, porém, não podem ser descartados, para que a tecnologia possa ser estabelecida de forma a apresentar bons resultados sob diferentes condições ambientais.

Outras análises nas plantas também são necessárias, para avaliar outros parâmetros que podem estar favorecendo o desenvolvimento vegetal sob ação do micro-organismo, como estímulo a indução de resistência a estresses, redução da produção de etileno, entre outros, citados na literatura por serem estimulados por outras espécies de MPCV.

O resultado mais importante deste trabalho, porém, consiste na comprovação de que a levedura *T. globosa* (linhagem 5S55), pode sim reproduzir seus excelentes resultados obtidos nos ensaios *in vitro*, quando inoculado nas plantas, *in vivo*. Desta forma, estamos no caminho para o desenvolvimento de um produto biológico que pode, futuramente, proporcionar aumento de produção, e talvez possa ser utilizado para tornar os manejos agronômicos mais sustentáveis e menos custosos, economicamente e ambientalmente.