



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

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE LEVEDURAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO
VEGETAL DE SOLO SOB CULTIVO DE MILHO ORGÂNICO**

RAFAELA LETÍCIA BRITO BISPO

**Araras
2022**



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

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE LEVEDURAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO
VEGETAL DE SOLO SOB CULTIVO DE MILHO ORGÂNICO**

RAFAELA LETÍCIA BRITO BISPO

ORIENTADOR: PROFA. DRA. SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI

CO-ORIENTADOR: PROFA. DRA. MÁRCIA MARIA ROSA MAGRI

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

2022

Brito Bispo, Rafaela Letícia

Isolamento e seleção de leveduras promotoras de crescimento vegetal de solo sob cultivo de milho orgânico / Rafaela Letícia Brito Bispo -- 2022.
88f.

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

Orientador (a): Sandra Regina Ceccato Antonini
Banca Examinadora: Márcia Maria Rosa Magri, Dânia Elisa Christofolletti Mazzeo Morales, Christiann Davis Tosta

Bibliografia

1. Promoção de crescimento vegetal; ácido indolacético; solubilização de fosfato.. I. Brito Bispo, Rafaela Letícia.
II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário 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

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Rafaela Letícia Brito Bispo, realizada em 29/08/2022.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Marcia Maria Rosa Magri (UFSCar)

Profa. Dra. Dânia Elisa Christofolletti Mazzeo Morales (UFSCar)

Prof. Dr. Christiann Davis Tosta (IFSP)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, a Ele toda honra e toda glória! Obrigada Senhor, por ter me guiado e sustentado por todo o caminho, e por não ter desistido!

Aos meus pais, irmãos, vó, minha prima Jéssica, meus padrinhos e também meus melhores amigos, por me apoiarem nessa etapa e entenderem minha ausência durante essa jornada.

Ao meu companheiro de vida Rafael, por todo apoio, principalmente nos inúmeros momentos de dificuldades que tivemos, e que mesmo assim, não mediu esforços para me ajudar nos momentos que mais precisei e que mesmo cansado me ajudou por tantas vezes no laboratório lavando os materiais e vidrarias.

À minha orientadora inicial, Profa. Dra. Anastácia Fontanetti, pela confiança e por me mostrar um novo caminho.

As minhas orientadoras Profa. Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini e Profa. Dra. Márcia Maria Rosa Magri, por todo o ensinamento, compreensão e paciência durante todo o desenvolvimento do mestrado, principalmente na escrita final.

Ao Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM), pela estrutura e materiais disponíveis durante todo o desenvolvimento do projeto.

À Universidade Federal de São Carlos, campus Araras, por toda estrutura e oportunidades, durante todos os anos desde a graduação.

Agradeço também ao Prof. Dr. Marco Aurélio Takita (Centro de Citricultura – Cordeirópolis – SP) pela identificação das leveduras, e ao Prof. Dr. Christiann Davis Tosta (IFSP – Matão), pela realização do teste de PCA. Agradeço ainda a todos os colaboradores que diretamente ou indiretamente contribuíram para o melhor resultado desse trabalho.

Agradeço à CAPES pelo suporte financeiro (Código de financiamento 001).

Por fim, agradeço aos membros da banca de qualificação que me auxiliaram no desenvolvimento final desse trabalho.

“Coragem! E sede fortes. Nada vos atemorize, e não os temais, porque o Senhor vosso Deus que marcha à vossa frente: ele não vos deixará e nem vos abandonará” (Deuteronômio 31:6).

Obrigada a todos!

SUMÁRIO

| | Página |
|--|--------|
| ÍNDICE DE TABELAS | i |
| ÍNDICE DE FIGURAS | ii |
| RESUMO | vi |
| ABSTRACT | vii |
| INTRODUÇÃO | 1 |
| OBJETIVOS | 3 |
| REVISÃO DA LITERATURA | 4 |
| 1 A cultura do milho (<i>Zea mays</i> L.)..... | 4 |
| 2 Microrganismos no solo..... | 5 |
| 3 Emprego de microrganismos na agricultura..... | 6 |
| 4 Leveduras promotoras de crescimento vegetal..... | 7 |
| LITERATURA CITADA | 10 |
| CAPÍTULO 1. Isolamento, seleção e caracterização de leveduras promotoras de crescimento vegetal de solo sob cultivo de milho orgânico | 14 |
| 1 Resumo..... | 14 |
| 2 Introdução..... | 14 |
| 3 Materiais e Métodos..... | 16 |
| 3.1 Caracterização das amostras de solo..... | 16 |
| 3.2 Isolamento de leveduras das amostras de solo..... | 17 |
| 3.3 Seleção das linhagens com potencial para promoção de crescimento vegetal..... | 18 |
| 3.3.1 Produção de Ácido Indolacético (AIA)..... | 18 |
| 3.3.2 Solubilização de fosfato tricálcico..... | 19 |
| 3.3.3 Antagonismo contra fungos fitopatogênicos..... | 20 |
| 3.4 Análise de Componente Principal..... | 20 |
| 3.5 Caracterização das linhagens..... | 21 |
| 3.6 Identificação das linhagens de levedura selecionadas..... | 21 |
| 4 Resultados e Discussão..... | 23 |
| 5 Conclusões..... | 40 |
| 6 Literatura citada..... | 40 |
| CAPÍTULO 2. Avaliação das leveduras selecionadas quanto a produção | |

| | |
|--|----|
| de AIA e solubilização de fosfato <i>in vitro</i> | 44 |
| 1 Resumo..... | 44 |
| 2 Introdução..... | 44 |
| 3 Materiais e Métodos..... | 46 |
| 3.1 Linhagens de leveduras avaliadas..... | 46 |
| 3.2 Produção de ácido indolacético (AIA) em meios líquidos..... | 47 |
| 3.2.1 Preparo do inóculo..... | 47 |
| 3.2.2 Avaliação da produção de AIA..... | 47 |
| 3.2.3 Curva de calibração para quantificação de AIA..... | 48 |
| 3.3 Solubilização de fosfato tricálcico em meios líquidos..... | 49 |
| 3.3.1 Avaliação da solubilização de fosfato tricálcico..... | 49 |
| 3.3.2 Construção da curva de calibração de fósforo..... | 50 |
| 4 Resultados e Discussão..... | 51 |
| 5 Conclusões..... | 71 |
| 6 Literatura citada..... | 72 |
| CAPÍTULO 3. Germinação e desenvolvimento inicial de milho tratado com células ou metabólitos de leveduras de solo | 76 |
| 1 Resumo..... | 76 |
| 2 Introdução..... | 77 |
| 3 Materiais e Métodos..... | 78 |
| 3.1 Material biológico..... | 78 |
| 3.2 Preparo de inóculo e metabólito para o tratamento das sementes de milho..... | 78 |
| 3.3 Tratamento das sementes..... | 79 |
| 3.4 Transplante das sementes pré-germinadas para vaso..... | 80 |
| 4 Resultados e Discussão..... | 80 |
| 5 Conclusões..... | 84 |
| 6 Literatura citada..... | 85 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS | 87 |

ÍNDICE DE TABELAS

Página

Capítulo 1

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Identificação das linhagens de levedura selecionadas pelo sequenciamento do domínio D1/D2 do gene 26S do rDNA..... | 39 |
|---|----|

Capítulo 2

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Relação do efeito dos tratamentos sobre o crescimento e produtividade de AIA pelas linhagens de leveduras avaliadas..... | 61 |
|---|----|

Capítulo 3

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Condições utilizadas para cada linhagem de levedura a partir dos resultados anteriores de crescimento e produção de AIA..... | 79 |
|---|----|

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Página |
|--|--------|
| Capítulo 1 | |
| Figura 1. Área do cultivo de milho na UFSCar..... | 16 |
| Figura 2. Etapas do isolamento de microrganismos do solo: a) Coleta de solo na camada 10-20 cm do solo; b) Diluição seriada das amostras e isolamento..... | 18 |
| Figura 3. Escala representativa da produção de AIA pelas leveduras; A) controle caldo batata suplementado com triptofano, B) (-) não produziu, C) (+-) produziu pouco, D) (+) produziu médio, E) (++) produziu muito..... | 19 |
| Figura 4. Proporção dos isolados de leveduras obtidos para cada tipo de solo de origem. MA (milho solteiro), MCA (milho + crotalária), MGA (milho + guandu), MCGA (milho + crotalária + guandu), MP (milho + composto orgânico), MCP (milho + crotalária + composto orgânico), MGP (milho + guandu + composto orgânico), MCGP (milho + crotalária + guandu + composto orgânico) | 24 |
| Figura 5. Reação do meio de cultivo das leveduras em meio BD com o reagente de Salkowsky. O número abaixo do microtubo indica a linhagem analisada, a letra C indica a reação controle..... | 26 |
| Figura 6. Distribuição de linhagens de leveduras produtoras de AIA isoladas nos diferentes tratamentos. MA (milho solteiro), MCA (milho + crotalária), MGA (milho + guandu), MCGA (milho + crotalária + guandu), MP (milho + composto orgânico), MCP (milho + crotalária + composto orgânico), MGP (milho + guandu + composto orgânico), MCGP (milho + crotalária + guandu + composto orgânico) | 27 |
| Figura 7. Solubilização de fosfato tricálcico com a formação de halo translúcido bem visível ao redor das colônias de leveduras..... | 29 |
| Figura 8. Índice de solubilização (IS) de fosfato observado pelas linhagens de leveduras isoladas. MA (milho solteiro), MCA (milho + crotalária), MGA (milho + guandu), MCGA (milho + crotalária + guandu), MP (milho + composto orgânico), MCP (milho + crotalária + composto orgânico), MGP (milho + guandu + composto orgânico), MCGP (milho + crotalária + guandu + composto orgânico)..... | 30 |

| | |
|---|----|
| Figura 9. Inibição <i>in vitro</i> do crescimento do fitopatógeno <i>F. verticillioides</i> (FUS) pelas linhagens isoladas de leveduras. Primeira foto da linha de cima à esquerda ilustra a placa controle. Demais placas apresentam cultivo pareado com identificação do número (1 – MCA1; 2- MCA2; 10- MGA10; 20- MP20; 7- MCP7) e a repetição analisada..... | 31 |
| Figura 10. Inibição <i>in vitro</i> do crescimento do fitopatógeno <i>G. candidum</i> (GEO) pelas linhagens isoladas de leveduras. Primeira foto da linha de cima à esquerda ilustra a placa controle. Demais placas apresentam cultivo pareado com identificação do número da linhagem (2- MCA2; 5- MA5; 16- MGA16; 25- MGCP25; 13- MGA13) e a repetição analisada..... | 32 |
| Figura 11. Análise de Componente Principal das leveduras isoladas e os mecanismos de promoção de crescimento vegetal, indicado nos vetores, onde os círculos representam os agrupamentos dos isolados com dois mecanismos..... | 35 |
| Figura 12. Caracterização fenotípica das linhagens de leveduras selecionadas com potencial para promoção de crescimento vegetal. Sendo, respectivamente, o aspecto da colônia, morfologia das células em aumento de 400x em microscópio óptico, curvas de crescimento em meio YPD e melaço..... | 37 |
| Capítulo 2 | |
| Figura 1. A) Curva padrão com a equação para a quantificação da produção de AIA. B) Coloração rosa indica a presença de AIA no meio, após a reação com reagente de Salkowski; quanto mais intensa a cor, maior a concentração de AIA na solução..... | 48 |
| Figura 2. A) Curva padrão com a equação para a quantificação da solubilização de fosfato. B) Coloração azul indica a presença de fósforo solúvel no meio, após a reação com reagente misto; quanto mais intensa a cor, maior a concentração de fósforo solúvel no meio..... | 50 |
| Figura 3. Produção de AIA e crescimento celular da linhagem MG9 (<i>T. delbrueckii</i>) em meio BD e melaço, na presença e ausência de triptofano..... | 52 |
| Figura 4. Produção de AIA e crescimento celular da linhagem MCP22 (<i>T. delbrueckii</i>) em meio BD e melaço, na presença e ausência de | |

| | |
|--|----|
| triptofano..... | 53 |
| Figura 5. Produção de AIA e crescimento celular da linhagem MP18 (<i>T. globosa</i>) em meio BD e melação, na presença e ausência de triptofano..... | 54 |
| Figura 6. Produção de AIA e crescimento celular da linhagem MGA12 (<i>Candida pseudointermedia</i>) em meio BD e melação, na presença e ausência de triptofano..... | 56 |
| Figura 7. Produção de AIA e crescimento celular da linhagem MA5 (<i>Aureobasidium melanogenum</i>) em meio BD e melação, na presença e ausência de triptofano..... | 58 |
| Figura 8. Produção de AIA e crescimento celular da linhagem MCP24 (<i>Trichosporon asahii</i>) em meio BD e melação, na presença e ausência de triptofano..... | 59 |
| Figura 9. Produção de AIA e crescimento celular da linhagem MGCP25 (<i>Cryptococcus laurentii</i>) em meio BD e melação, na presença e ausência de triptofano..... | 60 |
| Figura 10. Produtividade de AIA observada nas linhagens de levedura testadas..... | 61 |
| Figura 11. Solubilização de fosfato tricálcico e crescimento celular da linhagem MCP22 (<i>T. delbrueckii</i>) em meio NBRIP e melação..... | 65 |
| Figura 12. Solubilização de fosfato tricálcico e crescimento celular da linhagem MGA9 em meio NBRIP e melação..... | 66 |
| Figura 13. Solubilização de fosfato tricálcico e crescimento celular da linhagem MP18 (<i>T. globosa</i>) em meio NBRIP e melação..... | 66 |
| Figura 14. Solubilização de fosfato tricálcico e crescimento celular da linhagem MGA12 (<i>C. pseudointermedia</i>) em meio NBRIP e melação..... | 67 |
| Figura 15. Solubilização de fosfato tricálcico e crescimento celular da linhagem MA5 (<i>A. melanogenum</i>) em meio NBRIP e melação..... | 67 |
| Figura 16. Solubilização de fosfato tricálcico e crescimento celular da linhagem MCP24 (<i>Trichosporon asahii</i>) em meio NBRIP e melação..... | 68 |
| Figura 17. Solubilização de fosfato tricálcico e crescimento celular da linhagem MGCP25 (<i>Cryptococcus laurentii</i>) em meio NBRIP e melação..... | 68 |
| Figura 18. Valores de pH no meio de cultura NBRIP com adição (A) ou não (B) de fosfato tricálcico, no início (0 horas) e fim (72 horas) do período de | |

incubação..... 70

Figura 19. Valores de pH no meio de cultura de melão, com adição (A) ou não (B) de fosfato tricálcico, no início (0 horas) e fim (72 horas) do período de incubação..... 71

Capítulo 3

Figura 1. Germinação in vitro de sementes de milho tratadas com células ou metabólitos das leveduras e os controles (água, meio BD e melão). Primeira foto à esquerda ilustra a placa controle (água), a segunda foto sementes tratadas com metabólitos da linhagem MGA9 (*Torulaspóra delbrueckii*) e a terceira foto, sementes tratadas com células da linhagem MGA9 (*Torulaspóra delbrueckii*)..... 81

Figura 2. Dados de germinação (%) e número de sementes de milho germinadas por placa. Sementes tratadas com células ou metabólitos das leveduras e os controles (água, meio BD e melão)..... 81

Figura 3. Dados de comprimento de radícula e coleóptilo de sementes germinadas de milho tratadas com células ou metabólitos de leveduras e os controles (água, meio BD e melão)..... 82

Figura 4. Desenvolvimento das plântulas de milho tratadas com células ou metabólitos das leveduras e os controles (água, meio BD e melão). Primeira foto à esquerda ilustra aa plântulas controle (água), a segunda foto, as plântulas das sementes tratadas com metabólitos da linhagem MP18 (*Torulaspóra globosa*)..... 83

Figura 5. Dados de comprimento da parte aérea e massa seca de raiz de plantas de milho (12 dias após transplante) derivadas de sementes tratadas com células ou metabólitos de leveduras e os controles..... 83

ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE LEVEDURAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL DE SOLO SOB CULTIVO DE MILHO ORGÂNICO

Autor: RAFAELA LETÍCIA BRITO BISPO

Orientador: Profa. Dra. SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI

Co-orientador: Profa. Dra. MÁRCIA MARIA ROSA MAGRI

RESUMO

Os microrganismos promotores de crescimento vegetal são um grupo naturalmente encontrado em associação benéfica com as plantas, dentre esses, as leveduras têm apresentado resultados promissores. O objetivo do trabalho foi isolar, selecionar e caracterizar leveduras de solo cultivado com milho (solteiro e consorciado, com e sem adubação orgânica). Os isolados foram selecionados quanto à capacidade de produzir ácido indolacético (AIA), solubilizar fosfato e controlar fungos fitopatógenos *in vitro*, e caracterizados fenotipicamente. As linhagens selecionadas foram identificadas pelo sequenciamento do domínio D1/D2 do gene 26S do DNA ribossomal e avaliadas quanto à produção de AIA, solubilização de fosfato tricálcico e ao efeito da suspensão de células ou metabólitos no tratamento de sementes de milho. As linhagens identificadas foram: *Torulaspora delbrueckii* (MGA9, milho + guandu), *Torulaspora globosa* (MP18, milho + composto), *Torulaspora delbrueckii*, (MCP22, milho + crotalária + composto), *Aureobasidium melanogenum* (MA5, milho solteiro), *Candida pseudointermedia* (MGA12, milho + guandu), *Trichosporon asahii* (MCP24, milho + crotalária + composto) e *Cryptococcus laurentii* (MGCP25, milho + guandu + crotalária + composto). As linhagens MCP22 e MGA9 se destacaram quanto à produtividade de AIA em meio caldo de batata e melaço. Para todas as linhagens, o meio de cultura NBRIP ofereceu as melhores condições para a solubilização do fosfato tricálcico, exceção para a linhagem MA5. Nos testes *in vivo*, nenhum tratamento afetou a germinação das sementes. Para o desenvolvimento da radícula e coleóptilo, houve maior desenvolvimento nos tratamentos com os metabólitos das linhagens MGA9 e MCP22, mas resultaram em plantas com menor comprimento da parte aérea. No parâmetro raiz, os metabólitos da linhagem MCP22 se destacaram, mas as plantas se apresentaram com menor massa seca de raiz. Os melhores resultados foram apresentados pelas células da linhagem MCP22 e as células e metabólitos de MA5. Conclui-se que as leveduras isoladas de solo cultivado com milho apresentam mecanismos de promoção de crescimento vegetal e afetam o desenvolvimento da cultura desde o seu início, por isso, mais estudos são necessários para avaliar o potencial para a produção vegetal.

Palavras-chave: promoção de crescimento vegetal; ácido indolacético; solubilização de fosfato; produtos biológicos

ISOLATION AND SELECTION OF PLANT GROWTH PROMOTING YEAST FROM SOIL UNDER ORGANIC CORN CULTIVATION

Author: RAFAELA LETÍCIA BRITO BISPO

Adviser: Profa. Dra. SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI

Co-adviser: Profa. Dra. MÁRCIA MARIA ROSA MAGRI

ABSTRACT

The microorganisms that promote plant growth are a group naturally found in beneficial association with plants, among which, yeasts have shown promising results. The objective of this work was to isolate, select and characterize yeasts from soil cultivated with corn (single and intercropped, with and without organic fertilization). The isolates were selected for their ability to produce indoleacetic acid (IAA), solubilize phosphate and control phytopathogenic fungi *in vitro* and were phenotypically characterized. The selected strains were identified by sequencing of the D1/D2 domain in the 26S gene of the ribosomal DNA and evaluated to produce AIA, solubilization of tricalcium phosphate and the effects of the suspension of cells or metabolites in the treatment of corn seeds. The strains identified were: *Torulaspora delbrueckii* (MGA9, maize + pigeon pea), *Torulaspora globosa* (MP18, maize + compost), *Torulaspora delbrueckii*, (MCP22, maize + sunn hemp + compost), *Aureobasidium melanogenum* (MA5, single maize), *Candida pseudointermedia* (MGA12, corn + pigeon pea), *Trichosporon asahii* (MCP24, corn + sunn hemp + compost) and *Cryptococcus laurentii* (MGCP25, corn + pigeon pea + sunn hemp + compost). The strains MCP22 and MGA9 stood out in terms of AIA productivity in potato broth and molasses. For all strains, the NBRIP culture medium offered the best conditions for the solubilization of tricalcium phosphate, except for the MA5 strain. In *in vivo* tests, no treatment affected seed germination. For the development of the radicle and coleoptile, there was greater development in the treatments with the metabolites of the MGA9 and MCP22 strains but resulted in plants with shorter shoot length. Regarding the root parameter, the metabolites of the MCP22 strain stood out, but resulted in plants with lower root dry mass. The best results were presented by the cells of the MCP22 strain and the cells and metabolites of MA5. It is possible to conclude that yeasts isolated from soil cultivated with corn present mechanisms of plant growth promotion and affect the development of the culture since its beginning, therefore, more studies are necessary to evaluate the potential for plant production.

Keywords: plant growth promotion; indole acetic acid; phosphate solubilization; biological products

INTRODUÇÃO

Os microrganismos estão presentes em vários ecossistemas, dentre eles, no solo, e desempenham importantes papéis principalmente por liberarem nutrientes assimiláveis para as plantas, decomporem a matéria orgânica (KENNEDY; DORAN, 2002), sendo essenciais para a saúde das plantas (MA *et al.*, 2017). Podem promover o crescimento das plantas de forma direta, com a produção de fitormônios como a auxina, que está relacionada com estimulação da germinação das sementes, raízes, alongamento celular e no crescimento de plantas (NUTARATAT *et al.*, 2014). Podem atuar de forma indireta, auxiliando a nutrição das plantas, solubilizando minerais (SILVA *et al.*, 2021) ou controlando fitopatógenos e pragas (NUTARATAT *et al.*, 2014).

A degradação do meio ambiente causada principalmente pelo uso dos fertilizantes químicos utilizados para atender a necessidade dos nutrientes na agricultura impõe a busca por novas tecnologias que minimizem esse impacto. Dentre essas tecnologias estão sendo utilizados microrganismos que são capazes de promover o crescimento vegetal, com intuito de reduzir o impacto ao meio ambiente pelo uso excessivo de fertilizantes químicos (AROKYARAJ; JAGANATHAN, 2018).

Microrganismos promotores de crescimento vegetal (MPCV) são encontrados no solo, na filosfera e rizosfera, e atuam no desenvolvimento das plantas através de mecanismos que possibilitam a maior disponibilidade de nutrientes, fixação biológica de nitrogênio, solubilização de minerais, produção de hormônios, controle biológico, entre outros (BASHAN; HOLGUIN, 1997).

Dentre os grupos microbianos, as leveduras são fungos unicelulares com crescimento por brotamento ou fissão binária, que podem atuar como promotoras de crescimento vegetal (KURTZMAN *et al.*, 2011). A distribuição das leveduras no ambiente é bem ampla, sendo encontradas em diversos ecossistemas (BILEK *et al.*, 2020) e isoladas de vários tipos de solos, inclusive em solos extremos e em diferentes áreas geográficas (MESTRE *et al.*, 2011; BILEK *et al.*, 2020), devido à habilidade das leveduras em assimilar diversos compostos orgânicos, permitindo a sobrevivência e dispersão em vários nichos ecológicos (PHAFF; STARMER, 1987).

As leveduras na agricultura desempenham papel fundamental como biofertilizantes, na biorremediação e biocontrole através da produção de toxinas *killer* que podem causar a morte de outras espécies, além de serem utilizadas em

processos biotecnológicos (EL-TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2006). Apresentam uma grande variedade de espécies capazes de promover o crescimento das plantas, podendo atuar na produção de moléculas que mimetizam hormônios vegetais (NASSAR *et al.*, 2005), solubilização de fósforo e disponibilização para a planta (MIRABAL ALONSO *et al.*, 2018), inibição e controle de fitopatógenos (EL-TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2006), produção de sideróforo (SANSONE *et al.*, 2005), oxidação de N e S (FALIH; WAINWRIGHT, 1995) e podem estimular as associações micorrízicas (MIRABAL ALONSO *et al.*, 2018).

O isolamento e seleção de leveduras podem ser promissores nas aplicações tecnológicas na agricultura, por isso, a diversidade e como atuam no meio ambiente são informações importantes que ainda precisam ser esclarecidas. Assim, estudos com microrganismos e principalmente com leveduras que induzem e favorecem o crescimento das plantas podem contribuir para o desenvolvimento de tecnologias biológicas de promoção do crescimento vegetal, como uma alternativa na redução do uso de fertilizantes químicos (SANTOS *et al.*, 2015), auxiliando o aumento da produtividade (BRAGA JUNIOR *et al.*, 2018), maior rendimento do milho (MA *et al.*, 2017), diminuindo os custos da produção, e aumentando a sustentabilidade agrícola.

OBJETIVOS

Objetivo geral

O objetivo do trabalho foi isolar, selecionar e caracterizar leveduras promotoras de crescimento vegetal a partir de solo cultivado com milho sob manejo orgânico.

Objetivos específicos

- Isolar leveduras das amostras de solo sob cultivo de milho solteiro e consorciado, tratado com adubo orgânico ou não;
- Selecionar os isolados de leveduras quanto à capacidade de produção de ácido indolacético (AIA), solubilização de fosfato e controle biológico de fungos fitopatógenos *in vitro*;
- Identificar e avaliar as leveduras selecionadas quanto à produção de ácido indolacético e solubilização de fosfato em meios de caldo batata-dextrose e melaço de cana-de-açúcar;
- Avaliar a germinação e o desenvolvimento inicial de milho inoculado com as leveduras e com o filtrado livre de células, identificando a capacidade em promover o crescimento vegetal pelas leveduras testadas.

REVISÃO DA LITERATURA

1. A cultura do milho (*Zea mays* L.)

O milho (*Zea mays* L.) é uma planta herbácea pertencente à família Poaceae, monóica, com flores femininas (espigas) e flores masculinas (pendão). Espécie originária do México, apresenta cultivo anual, com o ciclo completo em torno de quatro a cinco meses. Pode ser encontrada tanto em clima tropical, como subtropical e temperado (SILVA *et al.*, 2021). O sistema radicular é fasciculado, podendo atingir a profundidade de 1,5 e 3,0 m, e possui raízes adventícias que colaboram na fixação do caule e na absorção de solução de sais minerais (FORNASIERI FILHO, 2007).

O milho é um dos cereais mais cultivados mundialmente, e o segundo grão mais plantado no Brasil, sendo Mato Grosso o estado com maior produção no país (ALVES *et al.*, 2015; CONTINI *et al.*, 2019). A estimativa brasileira da produção de grãos de milho em 2021/2022 deverá atingir 115,6 milhões de toneladas, um aumento de 32,8% em relação à safra anterior, conforme indica o 10º levantamento publicado da Safra em julho de 2022 (CONAB, 2022). O milho é considerado uma das principais culturas da agricultura familiar (GALVÃO *et al.*, 2014), e se destaca no segmento orgânico, apesar do Brasil não se configurar como produtor mundial de milho orgânico. Os dados estatísticos sobre a produção orgânica no país são incipientes e, por vezes, defasados, pois não há o levantamento periódico e a sistematização desses dados (GALVÃO *et al.*, 2014). Sabe-se porém, que existem por volta de 5.769 unidades produtoras de milho orgânico no país, com maior representação na Região Sudeste, que abriga 1.198 propriedades sendo 769 no estado de São Paulo (MAPA, 2020).

A crescente demanda por alimentos orgânicos posiciona o setor como um dos mais estratégicos economicamente. Há uma tendência de estabilização do consumo *per capita* dos produtos orgânicos, como cereais, raízes, tubérculos e carne nos próximos dez anos (LIMA *et al.*, 2020). O milho cultivado em consórcio ou cultivado em sistema de rotação de cultura pode ser beneficiado, pois esses manejos podem promover melhora na fertilidade do solo, contribuindo com as propriedades biológicas, químicas ou físicas do solo (RESENDE *et al.*, 2016). O consórcio de milho com leguminosas favorece os atributos físicos do solo e as leguminosas atuam como cobertura, a fim de reduzir a temperatura e umidade do solo, favorecendo os

atributos químicos e principalmente biológicos do solo (TREVISAN *et al.*, 2021), beneficiando assim os microrganismos presentes.

O guandu, uma leguminosa utilizada como alimento, forragem, adubo verde e quebra-vento, por se adaptar em diversas condições ambientais, é interessante para a rotação de cultura com o milho (ALVES *et al.*, 2004). As espécies leguminosas, por se associarem intimamente com as bactérias diazotróficas, conseguem estimular a fixação biológica de nitrogênio e promover um incremento do nutriente no solo (GARLAND *et al.*, 2017) e a crotalária é uma leguminosa empregada como objetivo de incrementar o nitrogênio através da fixação biológica de nitrogênio (RAST *et al.*, 2010), sem a redução da produtividade do milho.

2. Microrganismos no solo

O solo é um habitat complexo, que abriga vários microrganismos, tanto em quantidade como em diversidade, incluindo eucariotos e procariotos, com comunidades dinâmicas que interagem com o ambiente de forma ativa. A complexidade do solo faz com que este seja um dos ambientes naturais mais difíceis de serem estudados. Os microrganismos do solo podem ser influenciados por diversos fatores como a disponibilidade de água, nutrientes, oxigênio, pH (MOREIRA, 2019), a aplicação de insumos, o revolvimento do solo, a espécie vegetal cultivada na área e as alterações climáticas (LEAL *et al.*, 2021).

Segundo Moreira e Campos (2013), em apenas um grama de solo é possível encontrar cerca de 10^5 células de leveduras, 10^{12} células de bactérias e 25 km de hifas fúngicas. Devido à grande complexidade de fatores que são encontrados no solo, e à alta biodiversidade de espécies presentes, a grande maioria dos microrganismos do solo não pode ser cultivada em laboratório (XIA *et al.*, 2015), fazendo com que grande parte das espécies que o habitam permaneçam até hoje desconhecidas. Apesar disso, as pesquisas indicam que os microrganismos do solo contribuem para a formação do solo, atuam na decomposição da matéria orgânica, na remoção de toxinas do solo e nos ciclos biogeoquímicos do nitrogênio, carbono, fósforo e enxofre (ZHAO *et al.*, 2014), contribuem com a nutrição das plantas, com a fitossanidade, e são fundamentais para a fertilidade do solo e para a manutenção de sua estrutura física (MOREIRA, 2019).

O uso excessivo de fertilizantes e pesticidas pode alterar as características do solo, afetando a abundância e a composição da sua comunidade microbiana

(GARCÍA-ORENES *et al.*, 2013). No trabalho de Ma *et al.* (2017) os autores indicaram práticas agrícolas que podem melhorar a estrutura e a diversidade dos microrganismos do solo, como por exemplo a aplicação de fertilizantes orgânicos, os quais inibiram microrganismos deletérios e estimularam microrganismos benéficos no solo, promovendo o crescimento vegetal. A adubação orgânica consiste na utilização de recursos naturais e das atividades biológicas, disponibilizando nutrientes de várias formas, tais como na ciclagem de nutrientes, a partir de restos culturais, compostos e resíduos orgânicos, e através da adubação verde, empregando principalmente o uso das leguminosas (SEDIYAMA *et al.*, 2014), beneficiando os microrganismos benéficos e estimulando a diversidade do solo.

3. Emprego de microrganismos na agricultura

Os microrganismos do solo têm papel fundamental na biotecnologia como inoculantes na agricultura, atuam no controle biológico, na produção de fármacos em geral (antibióticos, corantes, enzimas etc.), na biorremediação entre outros, mesmo assim, ainda se conhece pouco sobre a diversidade microbiana (LEAL *et al.*, 2021).

Microrganismos que exibem mecanismos para serem utilizados como promotores de crescimento vegetal estão cada vez mais sendo estudados devido às interações mutualísticas entre o microbioma e as raízes das plantas (MILLAN *et al.*, 2020). Com isso, os microrganismos podem atuar de diversas formas no desenvolvimento das plantas, aumentando a resistência a estresses bióticos e abióticos, bem como contribuir para o crescimento das plantas. Essa contribuição no crescimento das plantas está relacionada a vários mecanismos, dentre eles, a produção de hormônios vegetais (ácido indolacético), a solubilização de fosfatos, a fixação de nitrogênio, a absorção de nutrientes, a quelação de ferro, a produção de amônia (NH₃) e a competição com os patógenos (NASSAR *et al.*, 2005; FREIMOSER *et al.*, 2019; MILLAN *et al.*, 2020).

Neste sentido, é importante que a seleção de novas linhagens de microrganismos promotores de crescimento seja realizada em área de produção orgânica já estabilizada. Estudos que avaliam estratégias para utilizar fontes de fertilizantes orgânicos em vez de fertilizantes químicos podem fornecer nutrientes necessários às plantas, melhorando o rendimento e a qualidade da cultura agrícola (BRAGA JUNIOR *et al.*, 2018), com baixo custo, e ainda contribuir para uma produção mais sustentável (KUO *et al.*, 2018; BLANCO-VARGAS *et al.*, 2020).

Com o aumento da produção de alimentos, e conseqüentemente aumento do uso de fertilizantes, a produção de biofertilizantes é essencial, pois estes são baseados em microrganismos e estão conquistando espaço, sendo mais utilizados na agricultura orgânica por não possuírem fertilizantes químicos. Alguns países já estão estabelecendo políticas regulatórias para o uso desses biofertilizantes, sendo que os maiores produtores de biofertilizantes são a Europa e a América do Norte (MILLAN *et al.*, 2020).

4. Leveduras promotoras de crescimento vegetal

Leveduras são fungos unicelulares (Reino Fungi, Domínio Eukarya), se reproduzem por brotação ou fissão, e se adaptam ao crescimento tanto em ambientes líquidos (em suspensão) quanto em ambientes sólidos (formando biofilme). São encontradas naturalmente no solo e nas plantas, porém em menor proporção quando comparadas às bactérias e fungos filamentosos (YURKOV, 2018).

A comunidade composta por leveduras no solo depende dos nutrientes que estão presentes e de microrganismos que atuam na quebra de polímeros recalcitrantes, para assim liberarem as formas assimiláveis para as leveduras (MOREIRA, 2019). A revisão apresentada por Botha (2011) aponta que algumas espécies de leveduras estão transitoriamente no solo, resultantes de restos animais, do decaimento de flores, frutos e folhas; mas também existem espécies que são permanentes no solo. As leveduras participam da manutenção da estrutura dos solos, formação de agregados, mineralização da matéria orgânica, ciclagem de nutrientes (N e S), formação de agregados e solubilização de fosfatos. As leveduras foram encontradas em diferentes tipos de solo, desde solos cultiváveis, florestais, como em ambientes extremos e a diversidade pode ser influenciada pela composição química do solo, temperatura e localização geográfica (MOREIRA, 2019).

Estudos mostram que leveduras têm potencial para serem utilizadas na inibição de patógenos, na produção de fitormônios (NASSAR *et al.*, 2005), na solubilização de fosfato, oxidação de N e S, e produção de sideróforos (AROKYARAJ; JAGANATHAN, 2018). A levedura *Saccharomyces cerevisiae* apresenta resultados promissores na promoção do crescimento de plantas. Arokyaraj e Jaganathan (2018) revelaram resultados promissores para o emprego

da levedura *Saccharomyces cerevisiae* como biofertilizante, pois foi observado que a inoculação da levedura promoveu melhorias nas propriedades do solo, na captação de nutrientes e na retenção de água.

Novos estudos são necessários para avaliar a capacidade das leveduras de promoverem o crescimento e o desenvolvimento de plantas de forma direta ou indireta (BOTHÁ, 2011). Leveduras são capazes de proporcionar um estímulo ao desenvolvimento vegetal através da produção de moléculas similares aos hormônios vegetais. Dentre estes, pode-se citar as auxinas, giberelinas, citocininas e etileno (NASSAR *et al.*, 2005). O ácido indolacético (AIA) é um derivado de indol da família das auxinas, considerado um hormônio de crescimento vegetal capaz de promover resposta rápida na planta como o aumento na alongação celular, na diferenciação e divisão celular (NASSAR *et al.*, 2005), nas respostas de luz e gravidade, na regulação do caimento das folhas e amadurecimento dos frutos (TEALEET *et al.*, 2006).

É possível encontrar trabalhos relatando produção de AIA por bactérias, fungos filamentosos e leveduras (NUTARATAT *et al.*, 2014). Nos estudos de Nassar *et al.* (2005), a levedura *Williopsis saturnus*, isolada de raiz de milho, apresentou produção de altos níveis de AIA e ácido indol pirúvico (IPYA) *in vitro*; o mesmo isolado, quando inoculado em mudas de milho, promoveu aumento do peso seco, comprimento das raízes e da parte aérea nas plantas adultas. A levedura *Rhodotorula* sp., a primeira levedura isolada endofiticamente da planta de *Populus*, também apresentou produção significativa de AIA *in vitro* (XIN *et al.*, 2009).

A solubilização de nutrientes essenciais é outra habilidade dos microrganismos para aumentar o crescimento das plantas. O fósforo (P) é um nutriente limitante para as plantas devido à sua adsorção no solo e à formação dos complexos minerais com outros elementos, tornando-o imobilizado no solo com o alumínio (Al), cálcio (Ca) e ferro (Fe). Alguns microrganismos do solo promotores de crescimento vegetal têm a habilidade de solubilizar as formas precipitadas de P (SARABIA *et al.* 2017), ou seja, esses microrganismos têm a capacidade de liberar o fosfato e fornecer o nutriente na forma solúvel para as plantas (NUTARATAT *et al.*, 2014).

Nakayanet *al.* (2013), em estudos *in vitro* com a espécie *Meyerozyma guilliermondii*, observaram a capacidade da levedura em solubilizar fosfato, proporcionando o aumento da absorção de alguns elementos dentre eles o fósforo

na parte aérea das plantas de milho. Além disso, a levedura promoveu o aumento da altura da planta e do peso seco da parte aérea, tornando-se potencialmente solubilizadora de fosfato e promotora de crescimento vegetal. Nutaratat *et al.* (2014) apresentaram resultado positivo para a solubilização de fosfato (Índice de Solubilização de 1,2) com uma linhagem de levedura *Torulaspota globosa* em meio sólido Pikovskaya com fosfato tricálcico.

O potencial uso de leveduras antagonistas como agentes de biocontrole é pouco explorado (FREIMOSER *et al.*, 2019). Os mecanismos que estão envolvidos nas atividades das leveduras que foram estudados até o momento estão relacionados com a competição por espaço e nutrientes, produção de toxinas, secreção de enzimas, liberação de compostos orgânicos voláteis, indução de resistência vegetal e micoparasitismo (WISNIEWSKI; DROBY, 2012). Outro mecanismo também identificado em leveduras é a produção de sideróforos, moléculas capazes de se prender ao ferro, o que exerce efeito indireto negativo para os fitopatógenos, uma vez que indisponibiliza o elemento para o fungo patogênico (NUTARATAT *et al.*, 2014).

A linhagem 1S112 de *Torulaspota globosa*, isolada da rizosfera de cana-de-açúcar, apresentou antagonismo contra o fungo fitopatógeno *Colletrotrichum sublineolum* através da produção de toxinas *killer*, o que causou deformidades nas hifas do fungo filamentosos (ROSA *et al.*, 2010).

LITERATURA CITADA

ALVES, B. M.; CARGNELUTTI FILHO, A.; BURIN, C.; SILVA, M. T. L. P. Divergência genética de milho transgênico em relação à produtividade de grãos e da qualidade nutricional. **Ciência Rural**, v. 45, n. 5, p. 884-891, 2015.

ALVES, S. M. C.; ABOUD, A. C. S.; RIBEIRO, R. L. D.; ALMEIDA D. L. Balanço do nitrogênio e fósforo em solo com cultivo orgânico de hortaliças após a incorporação de biomassa de guandu. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 11, p. 1111-1117, 2004.

AROKYARAJ, B.; JAGANATHAN, D. Effect of yeast as biopromotor for soil amendment on the growth of sorghum bicolor and *Arachis hypogea*. **Internacional Journal of Innovation Science and Research Technology**, v. 3, n. 10, 2018.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances. **Journal of Microbiology**, v. 43, p. 103-121, 1997.

BILEK, F. N.; REZKI, M. A.; GRONDIN, C.; YAKIA, N.; BEKKI, A. Plant growth promoting characteristics and stress tolerance of yeasts isolated from Algerian agricultural soils. **South Asian Journal of Experimental Biology**, v. 10, p. 413-426, 2020.

BLANCO-VARGAS, A. B.; RODRÍGUES-GACHA, L. M.; SANCHEZ-CASTRO, N.; GRAZONJARAMILO, R.; PEDROZA-CAMACHO, L. D.; POUTOU-PIN, R. A.; RIVERA-HOYOS, C. M.; DÍAZ-ARIZA, L. A.; PEDROZA-RODRÍGUEZ, A. M. Phosphate-solubilizing *Pseudomonas sp.*, and *Serratia sp.*, co-culture for *Allium cepa* L. growth promotion. **Heliyon**, v. 6, e05218, 2020.

BOTHA, A. The importance and ecology of yeasts in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, p.4-8, 2011.

BRAGA JUNIOR, G. M.; CHAGAS, L. F. B.; AMARAL, L. R. O.; MILLER, L. O.; CHAGAS JUNIOR, A. F. Efficiency of inoculation by *Bacillus subtilis* on soybean biomass and productivity. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 13, n. 4, p. 5571, 2018.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de grãos, v. 10 - Safra 2021/22 - Sétimo levantamento, p. 1-66, 2020. Disponível em: < <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>>. Acesso em: julho de 2022.

CONTINI, E.; MOTA, M. M.; MARRA, R.; BORGHI, E.; MIRANDA, R. A.; SILVA, A. F.; SILVA, D. D.; MACHADO, J. R.; COTA, L. V.; COSTA, R. V.; MENDES, S. M. Milho – Caracterização e desafios tecnológicos. EMBRAPA. Série Desafios do Agronegócio Brasileiro (NT2), 2019. Acesso em: julho de 2019. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/195075/1/Milho-caracterizacao.pdf>>.

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, n. 1, p.25-35, 2006.

FALIH, A. M.; WAINWRIGHT, M. Nitrification, S-oxidation and P-solubilization by the soil yeast *Williopsis californica* and by *Saccharomyces cerevisiae*. **Mycological Research**, v. 99, p. 200-204, 1995.

FREIMOSER, F. M.; RUEDA-MEIJA, M. P.; TILOCCA, B.; MIGHELI, Q. Biocontrol yeasts: mechanisms and applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 154, 2019.

GALVÃO, J. C. C.; MIRANDA, G. V.; TROGELLO, E.; FRITSCHÉ-NETO, R. Sete décadas de evolução do sistema produtivo da cultura do milho. **Revista Ceres**, v. 61, p. 819-828, 2014.

GARCÍA-ORENES, F.; MORUGÁN-CORONADO, A.; ZORNOZA, R.; SCOW, K. Changes in soil microbial community structure influenced by agricultural management practices in a Mediterranean agro-ecosystem. **PLoS ONE**, v. 8, e. 80522, 2013.

GARLAND, G.; BÜNEMANN, E. K.; OBERSON, A.; FROSSARD, E.; SIX, J. Plant-mediated rhizospheric interactions in maize-pigeon pea intercropping enhance soil aggregation and organic phosphorus storage. **Plant and Soil**, v. 415, p. 37-55, 2017.

KENNEDY, A.; DORAN, J. Sustainable agriculture: role of microorganisms. *In*: Bitton, G. (Org.) **Encyclopedia of Environmental Microbiology**. John Wiley & Sons, p. 3116-26, 2002.

KUO, C. Y.; CHOU, F. C.; CHEN, R. Y.; CHOU, J. Y. Phosphate-solubilizing characteristics of yeasts. **Mycosphere**, v. 9, n. 6, p. 1117-1131, 2018.

LEAL, M. L. de A.; CHAVES, J. da S.; SILVA, L. S. da; SOARES, R. B.; NASCIMENTO, J. P. S. do; MATOS, S. M. de; TEIXEIRA JUNIOR, D. L. T.; BRITO NETO, A. F. de B. Effect of management systems and land use on the population of soil microorganisms. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 9, e.21910917966, 2021.

LIMA, S. K.; GALIZA, M.; VALADARES, A.; ALVES, F. Produção e consumo de produtos orgânicos no mundo e no Brasil. Texto para discussão / Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada. Brasília: Rio de Janeiro: Ipea, 2020.

MA, Z.; XIE, Y.; ZHU, L.; CHENG, L.; XIAO, X.; ZHOU, C.; WANG, J. Which of soil microbes is in positive correlation to yields of maize (*Zea mays* L.)? **Plant, Soil and Environment**, v. 63, n. 12, p. 574-580, 2017.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Cadastro Nacional de Produtores Orgânicos. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/ptbr/assuntos/sustentabilidade/organicos/cadastro-nacional-produtores-organicos>>. Acesso em: maio de 2020.

MESTRE, M. C.; ROSA, C.A.; SAFAR, S. V. B.; LIBKIND, D.; FONTENLA, S. B. Yeast communities associated with the bulk-soil, rhizosphere and ectomycorrhizosphere of a *Nothofagus pumilio* forest in northwestern Patagonia, Argentina. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 78, p. 531-541, 2011.

MILLAN, A. F. S.; FARRAN, I.; LARRAYA, L.; ANCIN, M.; ARREGUI, L. M.; VERAMENDI, J. Plant growth-promoting traits of yeasts isolated from Spanish vineyards: benefits for seedling development. **Microbiological Research**, v. 237, e. 126480, 2020.

MIRABAL, A. L.; KLEINER, D.; ORTEGA, E. Spores of the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* host yeasts that solubilize phosphate and accumulate polyphosphates. **Mycorrhiza**, v. 18, p. 197-204, 2008.

MOREIRA, G. A. M. **Diversidade e ecologia de leveduras em solos brasileiros**. 2019. 186 p. Tese (Doutorado de Biologia Microbiana), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília – UnB, Brasília, 2019.

NAKAYAN, P.; HAMEED, A.; SINGH, S.; YOUNG, L. S.; HUNG, M. H.; YOUNG, C. C. Phosphate-solubilizing soil yeast *Meyerozyma guilliermondii* CC1 improves maize (*Zea mays* L.) productivity and minimizes requisite chemical fertilization. **Plant and Soil**, v. 373, n. 1/2, p. 301-315, 2013.

NASSAR, A. H.; EL-TARABILY, K. A.; SIVASITHAMPARAM, K. Promotion of plant growth by an auxin producing isolate of the yeast *Williopsis saturnus* endophytic in maize (*Zea mays* L.) roots. **Biology and Fertility of Soils**, v. 42, p. 97-108, 2005.

NUTARATAT, P.; SRISUK, N.; ARUNRATTIYAKORN, P.; LIMTONG, S. Plant growthpromoting traits of epiphytic and endophytic yeasts isolated from rice and sugar cane leaves in Thailand. **Fungal Biology**, v. 118, p. 683-94, 2014.

PHAFF, H.J.; STARMER, W.T. Yeasts associated with plants, insects, and soils, p. 123-180. In: A. H. ROSE; J. S. HARRISON (eds.). **The yeasts**, London: Academic Press, 508 p., 1987.

RAST, H.; LIEDGENS, M.; SANGAKKARA, U. R.; STAMP, P. Early growth of *Crotalaria* (*Crotalaria juncea*), *Tithonia* (*Tithonia diversifolia*), and maize (*Zea mays*) as affected by soil fertility and phosphorus fertilizer under pot and field conditions. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 41, n. 14, p. 1655-1664, 2010.

RESENDE, A. V.; FONTOURA, S. M. V.; BORGHI, E.; SANTOS, F. C.; KAPPES, C.; MOREIRA, S. G.; OLIVEIRA JÚNIOR, A.; BORIN, A. L. D. C. Solos de fertilidade construída: características, funcionamento e manejo. **Informações Agronômicas**, n. 156, p. 1-19, 2016.

ROSA, M. M.; TAU-K-TORNISIELO, S. M.; RAMPAZZO, P. E.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Evaluation of the biological control by the yeast *Torulaspora globosa* against *Colletotrichum sublineolum* in sorghum. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 8, p. 1491-1502, 2010.

- SANSONE, G.; REZZA, I.; CALVENTE, V.; BENUZZI, D.; TOSETTI, M. I. S. D. Control of *Botrytis cinerea* strains resistant to iprodione in apple with rhodotorulic acid and yeasts. **Postharvest Biology and Technology**, v. 35, p. 245-251, 2005.
- SANTOS, J. da S.; VIANA, T. de O.; JESUS, C. M. de; BALDANI, V. L. D.; FERREIRA, J. S. Inoculation and isolation of plant growth-promoting bacteria in maize grown in Vitória da Conquista, Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, p. 78-85, 2015.
- SARABIA, M.; JAKOBSEN, I.; GRONLUND, M.; CARREON-ABUD, Y.; LARSEN, J. Rhizosphere yeasts improve P uptake of a maize arbuscular mycorrhizal association. **Applied Soil Ecology**, v. 125, p. 18-25, 2017.
- SEDIYAMA, M. A. N.; SANTOS, I. C.; LIMA, P. C. Cultivo de hortaliças no sistema orgânico. **Revista Ceres**, v. 61, p. 829-837, 2014.
- SILVA, D. F.; GARCIA, P. H. de M.; SANTOS, G. C. de L.; FARIAS, I. M. S. C. de; PÁDUA, G. V. G. de; PEREIRA, P. H. B.; SILVA, F. E. da; BATISTA, R. F.; GONZAGA NETO, S.; CABRAL, A. M. D. Morphological characteristics, genetic improvement and planting density of sorghum and corn crops: a review. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 3, e.12310313172, 2021.
- TEALEET, W. D.; PAPONOV, I. A.; PALME, K. Auxin in action: signaling, transport and the control of plant growth and development. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, p. 847-859, 2006.
- TREVISAN, M.; SILVA, L. F. S.; FONTANETTI, A.; GALLO, A. S.; GUIMARÃES, N. F. Temperatura e umidade do solo no consórcio de milho com *Crotalaria spectabilis* e *Cajanus cajan* em sistema orgânico. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 14, e539101422443, 2021.
- XIA, Y.; DEBOLT, S.; DREYER, J.; SCOTT, D.; WILLIAMS, M. A. Characterization of culturable bacterial endophytes and their capacity to promote plant growth from plants grown using organic or conventional practices. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 490, 2015.
- XIN, G.; GLAWE, D.; DOTY, S. L. Characterization of three endophytic, indole-3-acetic acid producing yeasts occurring in *Populus* trees. **Mycological Research**, v. 3, p. 973-980, 2009.
- YURKOV, A. M. Yeasts of the soil - obscure but precious. **Yeast**, v. 35, p. 369-78, 2018.
- ZHAO, K.; PENTTINEN, P.; ZHANG, X. P.; AO, X. L.; LIU, M. K.; YU, X. M.; CHEN, Q. Maize rhizosphere in Sichuan, China, hosts plant growth promoting *Burkholderiacepacia* with phosphate solubilizing and antifungal abilities. **Microbiological Research**, v. 169, p. 76-82, 2014.

CAPÍTULO 1. Isolamento, seleção e caracterização de leveduras promotoras de crescimento vegetal de solo sob cultivo de milho orgânico

1. Resumo

As leveduras são fungos unicelulares encontrados naturalmente no solo e que podem atuar em associação com as plantas, produzindo fitormônios, solubilizando minerais, e controlando patógenos. Apesar disso, são pouco estudados quanto ao seu potencial de emprego como promotores de crescimento vegetal. O objetivo deste trabalho foi isolar, selecionar e caracterizar leveduras de solo cultivado com milho, consorciado ou não, adubados ou não com composto orgânico. As amostras de solo foram plaqueadas em meio YPD, e as colônias morfológicamente distintas foram isoladas em cultura pura. Os isolados foram analisados quanto aos mecanismos relacionados à promoção de crescimento vegetal (produção de ácido indolacético (AIA), solubilização de fosfato e antagonismo à fitopatógenos), e também foram caracterizados fenotipicamente. Foram isoladas 28 colônias de leveduras, sendo que destas, 39% isoladas do tratamento MGA (milho com guandu e com composto), 21% do tratamento MP (milho com composto), os tratamentos MA (milho sem composto), MCA (milho com crotalária sem composto) e MCP (milho com crotalária e com composto) com 11% em cada, e por último o tratamento MGCP (milho com guandu e crotalária, com composto) com 7% dos isolados. Do total de leveduras isoladas, 23 linhagens (82%) apresentaram resultados positivos para os três mecanismos de promoção de crescimento vegetal testados. As linhagens selecionadas, após os testes iniciais e a caracterização fenotípica, foram identificadas por sequenciamento do domínio D1/D2 do gene 26S do rDNA como: MGA9 (*Torulaspota delbrueckii*), MP18 (*Torulaspota globosa*), MCP22 (*Torulaspota delbrueckii*), MA5 (*Aureobasidium melanogenum*), MGA12 (*Candida pseudointermedia*), MCP24 (*Trichosporon asahii*) e MGCP25 (*Cryptococcus laurentii*).

2. Introdução

As leveduras são fungos unicelulares que habitam diversos ecossistemas, sendo que sua presença no solo é influenciada pela diversidade e pela espécie vegetal cultivada. São encontradas no solo, principalmente próximas às raízes das plantas, pois assim conseguem assimilar o carbono exsudado pelo sistema radicular

vegetal (BOTHA, 2011; YURKOV *et al.*, 2018). As leveduras podem assimilar diferentes fontes de carbono e nitrogênio (HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2021), e devido à sua ampla capacidade nutricional e rápida multiplicação, estão em abundância no ecossistema edáfico. Podem atuar como agentes benéficos à produção vegetal, atuando como promotores de crescimento de plantas. Dentre os mecanismos observados em leveduras de solo pode-se citar a disponibilização de nutrientes solúveis às plantas, a produção de fitormônios que atuam diretamente no crescimento vegetal (HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2021) e o controle biológico de microrganismos patogênicos ou deletérios às plantas.

O fósforo é o elemento menos disponível para as plantas no solo, porém é o segundo nutriente mais exigido, sendo que sua deficiência resulta na redução da produtividade das culturas (KHAN *et al.*, 2014). Microrganismos do solo, dentre eles as leveduras, podem disponibilizar fósforo para as plantas a partir de fontes inorgânicas insolúveis. Uma das estratégias que os microrganismos utilizam para a solubilização de P é através da produção de ácidos orgânicos (KHAN *et al.*, 2014). O ácido indolacético (AIA) é o principal integrante do grupo das auxinas, fitormônio que favorece o crescimento vegetal, regulando vários processos fisiológicos e o desenvolvimento vegetal. A produção de AIA pelas leveduras depende de vários fatores, como a espécie utilizada, a fase de crescimento, a presença e concentração de moléculas precursoras e/ou as fontes de nutrientes (GIRI; SHARMA, 2020).

Outro mecanismo utilizado pelas leveduras para auxiliar as plantas consiste na ação antagônica contra fitopatógenos, por meio de toxinas *killer*, sideróforos, competição por espaço e nutriente (SPADARO; DROBY, 2016), podendo também atuar em resposta ao estresse por salinidade, temperatura, toxicidade, ativando vários mecanismos de defesa, ou seja, produzindo diferentes compostos para reduzir o estresse (FU *et al.*, 2016). Considerando que as leveduras apresentam grande potencial como promotoras de crescimento vegetal, e que há necessidade de complementar o conhecimento sobre a presença desse grupo no solo associado ao cultivo de milho em condições orgânicas, o objetivo deste trabalho foi isolar leveduras das amostras de solo sob cultivo de milho solteiro e em consórcio, tratado com adubo orgânico ou não, selecionar e avaliar os isolados de leveduras quanto à capacidade de produção de AIA, solubilização de fosfato e controle biológico de fitopatógenos *in vitro*.

3. Materiais e Métodos

3.1. Caracterização das amostras de solo

A área de amostragem está localizada no campus da Universidade Federal de São Carlos, na cidade de Araras, estado de São Paulo, coordenadas geográficas latitude 22°18'00" S, longitude 47°23'03" W e altitude média de 707 m (PERES *et al.*, 2013; ROCHA, 2017) (Figura 1). O clima da região é Cwa, caracterizado como tropical úmido, com verões quentes e os invernos secos (KÖPPER, 1948). A precipitação média da duração do período do cultivo foi de 136,8 mm, a temperatura média mínima 19,53°C e a média da temperatura máxima 25,25 °C (CIIAGRO, 2021). O solo da área é do tipo Nitossolo Vermelho Distroférico latossólico (NVdf) de textura argilosa (YOSHIDA; STOLF, 2016).

Figura 1. Área do cultivo de milho na UFSCar.



Fonte: Google Earth, 2022.

As amostras de solo foram coletadas em área experimental cultivada em sistema orgânico há 11 anos. No momento da coleta das amostras, a área estava sob cultivo de milho (híbrido simples P3898), consorciado ou não com adubo verde, crotalária (*Crotalaria spectabilis*) e/ou guandu-anão (*Cajanus cajan*) cultivar IAPAR 43. No estádio V4 foi realizada a aplicação na superfície do solo, nas linhas do milho, e na metade da área, do composto comercial Visafertil®, na dose de 13,27 t ha⁻¹. O composto apresenta a seguinte constituição: N (1,90%), P₂O₅ (1,48%), K (1,45%), CaO₅ (11,53%), MgO (1,32%), SO₄ (1,01%), M.O (20,69%), Cu (100 mg

dm^{-3}), Fe (18977 mg dm^{-3}), Mn (566 mg dm^{-3}), Zn (153 mg dm^{-3}), umidade de 18% e densidade $0,662 \text{ kg L}^{-1}$.

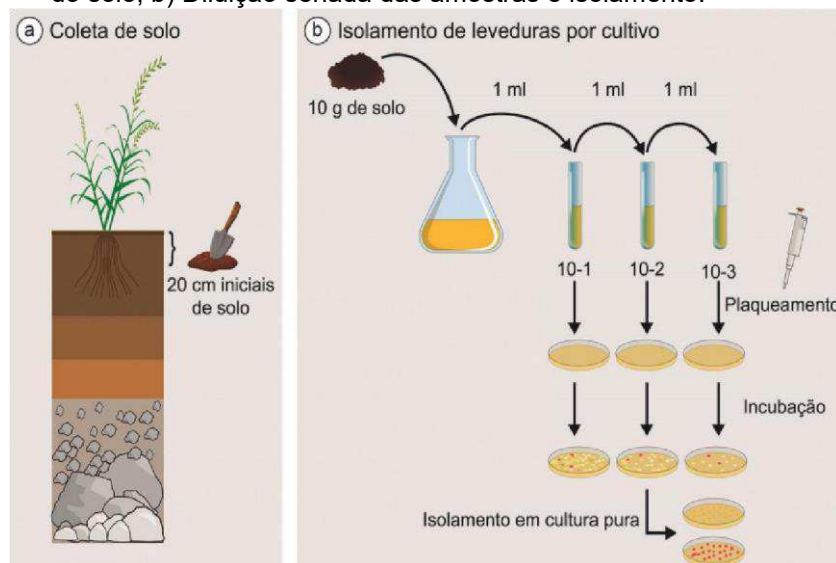
A primeira coleta das amostras de solo foi realizada em 07/03/2021, quando o milho estava no estágio V10 (dez folhas expandidas), e a segunda foi realizada em 23/05/2021, quando o milho estava no estágio de maturidade fisiológica (R6) (pamonha para farináceo). As amostras foram coletadas próximo da raiz, na camada agricultável (entre 0 e 20 cm de profundidade) (Figura 2). Para a coleta foi utilizado trado, com o qual foram realizadas três coletas por linha de plantio, em cada um dos tratamentos, com um total de 24 amostras. As amostras de cada tratamento foram homogeneizadas em balde, para a obtenção de uma amostra composta de cada tratamento, compondo ao final oito amostras compostas. O solo foi colocado em sacos plásticos identificados, armazenados em caixa térmica, e levados para o Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM), no campus da Universidade Federal de São Carlos, em Araras/SP, para análise. Quando não analisadas no mesmo dia da amostragem, as amostras de solo foram mantidas em geladeira a 4°C e analisadas no máximo até 48 horas. Neste caso, antes da análise, as amostras foram pré-incubadas em condições de temperatura ambiente para reativação dos microrganismos (PIRES *et al.*, 2006).

3.2. Isolamento de leveduras das amostras de solo

Amostras de 10 g de solo foram diluídas em 90 mL de solução salina (NaCl 0,85%) esterilizada, em frascos Erlenmeyers de 250 mL. Os frascos foram mantidos em agitação por 30 minutos a 160 rpm. Em seguida foi realizada a diluição seriada da suspensão até obtenção da diluição 10^{-5} , conforme citado por Neder (1992). As diluições de 10^{-2} a 10^{-5} foram pipetadas na superfície do meio de cultura sólido em placa de Petri com o emprego do método de semeadura em superfície. Foi utilizado o meio de cultura YPD (*Yeast Extract-Peptone-Dextrose*), com 10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona, 20 g/L de glicose e 17 g/L de ágar, com a adição de 1 mL/L do antibiótico cloranfenicol na concentração final de 50 mg/L (Figura 2).

As placas foram incubadas a 28°C , com o acompanhamento diário do desenvolvimento das colônias, as quais foram repicadas para nova placa para obtenção de culturas puras.

Figura 2. Etapas do isolamento de microrganismos do solo: a) Coleta de solo na camada 10-20 cm do solo; b) Diluição seriada das amostras e isolamento.



Fonte: MOREIRA (2019).

As culturas puras foram selecionadas visualmente, considerando características morfológicas distintas para obtenção da maior diversidade de espécies. Nessa etapa, foram excluídos os fungos filamentosos e bactérias através de análise macroscópica (características da colônia), e microscópicas (avaliação da célula em microscópio óptico). As linhagens foram mantidas em tubo de ensaio com meio inclinado YPD, cobertas com óleo mineral, em geladeira (4° C) até a realização de novas análises.

3.3. Seleção das linhagens com potencial para promoção de crescimento vegetal

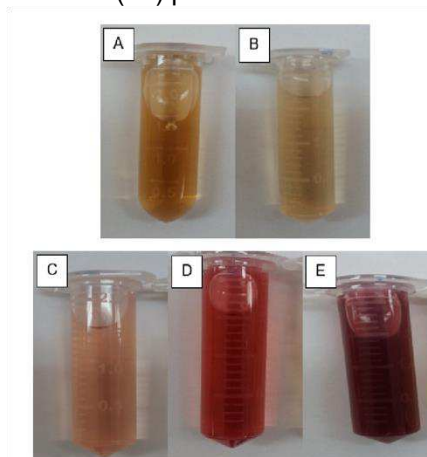
3.3.1. Produção de ácido indolacético (AIA)

O ensaio consistiu em análise qualitativa para seleção das linhagens produtoras de AIA com o emprego da metodologia de Bric *et al.* (1991). Em tubos Falcon de 50 mL foram colocados 10 mL do meio de cultura líquido YPD ou caldo BD (Caldo de Batata-Dextrose, Kasvi®), ambos suplementados com triptofano (0,54 g/mL), aminoácido utilizado como precursor na produção de AIA pela maioria dos microrganismos (IGNATOVA *et al.*, 2015). Foi realizada a inoculação de uma alçada da linhagem a ser avaliada no meio. Os tubos foram incubados a 30°C em agitação a 160 rpm por 48 horas. Para determinar a produção de AIA, os cultivos foram centrifugados durante 3 minutos a 3000 rpm. Logo após, 1 mL do sobrenadante foi transferido para microtubos nos quais foi adicionado 1 mL do reagente de Salkowsky

(ácido perclórico 35% e cloreto de ferro 0,5 M dissolvidos em água destilada), seguido de leve agitação para homogeneizar a mistura, a qual foi mantida em temperatura ambiente, em ambiente escuro por 30 minutos (GORDON; WEBER, 1951).

Após esse período foi avaliada a mudança de cor do meio para rosa, que indica a presença de AIA na solução. Uma escala foi criada para caracterizar qualitativamente a produção de AIA pelas leveduras, considerando que quanto mais intensa a cor rosa, maior a concentração de AIA no meio. Assim foi definida a seguinte escala: (-) não produziu, (+-) produziu pouco, (+) produziu médio e (++) produziu muito, de acordo com a Figura 3.

Figura 3. Escala representativa da produção de AIA pelas leveduras; A) controle caldo batata suplementado com triptofano, B) (-) não produziu, C) (+-) produziu pouco, D) (+) produziu médio, E) (++) produziu muito.



Fonte: Elaborado pela própria autora (2022).

3.3.2. Solubilização de fosfato tricálcico

Para a seleção das linhagens solubilizadoras de fosfato foi utilizada a metodologia de Freitas *et al.* (1997), no qual utiliza-se o meio de cultura BDA (Batata-Dextrose Agar, Kasvi®) suplementado com 5 g/L de extrato de levedura. Antes de verter o meio nas placas de Petri, adicionou-se ao meio as soluções de K_2HPO_4 10% (50 mL/L) e $CaCl_2$ 10% (10 mL/L), ambas esterilizadas por filtração em membrana de 0,22 μm . As leveduras foram inoculadas pontualmente no centro da placa, e estas foram incubadas por 48 horas a 30°C. A formação de um halo translúcido ao redor da colônia do microrganismo indica resultado positivo para a solubilização do fosfato no meio. O índice de solubilização (IS) foi calculado, utilizando a relação entre o diâmetro da colônia com halo e o diâmetro da colônia

sem o halo, considerando que: IS baixo = menor que 2; IS médio = maior que 2, menor que 4; IS alto = maior que 4.

3.3.3. Antagonismo contra fungos fitopatogênicos

Para o teste de antagonismo, foi utilizada a técnica de cultivo pareado em placas de Petri com meio de cultura BDA. A técnica consiste na inoculação em lados opostos da placa do fungo fitopatogênico *Fusarium verticillioides* (isolado da cana-de-açúcar) e *Geotrichum candidum* (cedido pelo Instituto Agrônomo de Campinas-IAC) e do antagonista (linhagem de levedura testada). É realizada a observação do desenvolvimento do fungo fitopatogênico comparado a uma placa controle (somente o fungo sem o antagonista). A inoculação da levedura foi realizada com uma alçada de células retirada de uma colônia em crescimento ativo, a qual foi estriada em um dos lados da placa. Um fragmento de micélio do fungo fitopatogênico de 5 mm de diâmetro, em crescimento ativo, foi colocado no lado oposto. As placas foram incubadas a 30°C até o crescimento do fungo controle em toda a placa. As leveduras que afetaram o crescimento do fungo fitopatogênico comparado ao controle foram consideradas antagonistas.

Para a avaliação qualitativa do antagonismo foi utilizada uma escala de acordo com Rosa (2009): fungo filamentososo cresce independente da presença do microrganismo testado (0); fungo filamentososo cresce até o limite da colônia do microrganismo (+); formação de halo de inibição (++); desaceleração do desenvolvimento micelial do fungo filamentososo, mas este no final se desenvolve por cima do microrganismo testado (+/-).

3.4. Análise de Componente Principal

Foi utilizada a Análise de Componente Principal ou PCA (*Principal Component Analysis*) a partir de uma matriz binária de dados, na qual as linhas compuseram as linhagens isoladas e as colunas as características aplicadas aos resultados de produção de AIA e solubilização de fosfato. Os resultados foram classificados em uma escala para a produção de AIA: (0) não produziu, (1) produziu pouco, (2) produziu médio e (3) produção alta; e para a solubilização de fosfato: (0) não solubilizou, (1) baixa solubilização, (2) média solubilização. Foi utilizado o coeficiente de Pearson-n na ferramenta XLSTAT 2021.2.2 (BEHBAHANI *et al.*, 2017).

3.5. Caracterização das linhagens

Foi realizada a caracterização morfológica das colônias e células das leveduras isoladas. Para tanto as linhagens foram cultivadas em placas de Petri com meio YPD sólido a 28°C por 5 dias. Em seguida foram avaliadas as características da colônia (cor, borda, aspecto, textura), e as células foram observadas em microscópio óptico (400x).

A avaliação do perfil de crescimento das leveduras foi realizada em meio de cultura YPD e melaço clarificado (20 g/L açúcar redutor total - ART). Para o preparo do melaço clarificado a 20 g/L de ART, o melaço (obtido na Usina São João – Araras – SP) foi diluído e homogeneizado em água destilada, levado ao banho-maria a 60-65° C por 15 minutos, em seguida, filtrado em funil com algodão e adicionado NaH_2PO_4 – fosfato de sódio monobásico, na proporção de 2,5 g/L de filtrado. Em seguida o melaço foi colocado em frasco e levado a autoclave em vapor fluente por 15 minutos. A seguir, permaneceu em repouso por 48 horas, sendo que após esse período, determinou-se o teor de ART pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico - ADNS (MILLER, 1959) do sobrenadante para corrigir o teor de açúcar para 20 g/L, diluindo em água destilada. Para a avaliação do perfil de crescimento, inicialmente foi preparado o inóculo com o cultivo das leveduras (uma alçada da colônia) em tubos Falcon de 50 mL contendo volume final de 10 mL de meio YPD ou melaço clarificado a 20 g/L de ART, a 30°C por 48 horas, em triplicata. Em seguida, 20 μL do inóculo foram utilizados para as avaliações em microplacas de 96 poços ('Costar 96 Flat Bottom Transparent Polystyrene'), com 180 μL do meio de cultura YPD ou melaço, tendo como controle negativo o meio de cultivo sem levedura. As microplacas foram incubadas a temperatura de 30°C, 160 rpm de agitação (aproximadamente 5 mm de amplitude orbital), com intervalos de leitura da densidade óptica (600 nm) a cada 15 minutos para avaliar o crescimento celular, por 30 horas, utilizando a leitora de microplacas Tecan Infinite[®]M200.

3.6. Identificação das linhagens de levedura selecionadas

As linhagens que se destacaram quanto aos mecanismos de promoção de crescimento vegetal, com características morfológicas distintas, e que tiveram crescimento destacado nos meios testados, foram selecionadas como potenciais candidatas para os testes posteriores. As leveduras foram identificadas utilizando

amplificação e sequenciamento do domínio D1/D2 do gene 26S do DNA ribossomal (rDNA).

Para a extração do DNA das leveduras, foram coletadas células de colônia em crescimento ativo de placas de Petri, e preparada uma suspensão em tubo Falcon com 4 mL de meio YPD líquido. Os tubos foram incubados a 28°C sob agitação de 160 rpm por cerca de 12-16 horas. No dia seguinte as culturas foram transferidas para microtubos de 1,5 mL e centrifugadas. O sobrenadante foi descartado e as células resuspensas em 100 µL de uma solução de SDS 1% - LiOAc 200 mM, seguida da incubação a 70°C por 15 minutos. Em seguida, 300 µL de etanol a 95% foram adicionados, as amostras foram agitadas em vórtex e centrifugadas a 14.000 rpm por 3 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado, e o DNA foi ressuspendido em 100 µL de tampão Tris-HCl/EDTA (TE).

Para a amplificação foi utilizado o protocolo da enzima GoTaq®. Em microtubos de 0,2 mL foram adicionados: 12,5 µL do GoTaq® Master Mix, 2 µL de DNA, 0,5 µL de cada primer (NL1: 5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3'; NL4: 5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACGG-3') na concentração de 5 mM e o volume foi completado para 25 µL com água milliQ autoclavada. O termociclador foi programado de acordo com o protocolo dos primers utilizados (desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e uma extensão final de 3 minutos a 72°C). A purificação do produto de PCR foi realizada com o kit "Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System", com protocolo segundo orientações do fabricante.

Foi utilizado o "pGEM®-T Vector System I" para a clonagem do amplicon. Para a ligação, em tubos de 0,2 mL foram adicionados: 1 µL do pGEM®-T Vector, 1 µL da T4 DNA Ligase, 5 µL do Ligation Buffer e 3 µL do produto de PCR purificado. A ligação foi incubada por 3 dias a -4°C. Para a transformação, 1 µL da ligação foi adicionado a 50 µL de células competentes de *Escherichia coli* DH5, seguido de incubação em gelo por 30 minutos. Após este tempo, as células foram incubadas a 42°C por 90 segundos e em gelo novamente por 3 minutos. Um volume de 800 µL de meio SOC (meio SOB "Super Optimal Broth" com adição de glicose) foi adicionado às células que, em seguida, foram incubadas a 37°C sob rotação de 200 rpm por 45 minutos. A suspensão foi centrifugada a 14.000 rpm por 1 minuto e grande parte do sobrenadante foi descartado, permanecendo aproximadamente 100 µL deste. O pellet foi diluído no sobrenadante restante e plaqueado em meio Luria-

Bertani (LB) sólido com 50 µg/mL de Ampicilina. As placas contendo 17 µL de XGAL (20 mg/mL) e 8 µL de IPTG (100 mM) foram incubadas por 12-16 horas a 37°C. As colônias brancas foram selecionadas e inoculadas em tubos Falcon com aproximadamente 4 mL de meio LB com 50 µg/mL de Ampicilina, que foram incubados por 12-16 horas a 37°C sob agitação de 160 rpm. Para a purificação do plasmídeo transformado, foi utilizado o kit “Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System”, com protocolo segundo orientações do fabricante.

O sequenciamento foi realizado com o kit BigDye™ Terminator v3.1 CycleSequencing Kit (Thermo Fischer®) e os primers T7 promoter primer (TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG) ou SP6 promoter primer (ATT TAG GTG ACA CTA TAG), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA foi injetado no sequenciador automático ABI3730 (Applied Biosystems®) e as sequências obtidas foram analisadas utilizando a ferramenta BLASTn no site do NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

4. Resultados e Discussão

4.1. Isolamento das leveduras

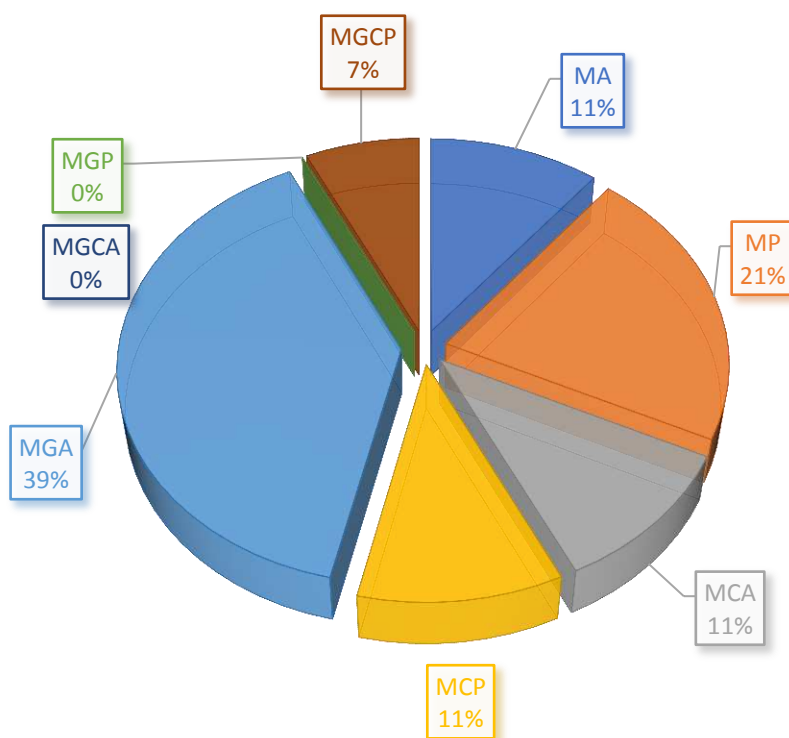
A partir das amostras de solo obtidas na primeira coleta, foram isoladas 7 linhagens de leveduras, sendo 3 isolados do milho solteiro, 3 do milho com crotalária, e 1 do milho consorciado com guandu. Das 7 linhagens, 5 foram isoladas de amostras de solo sem adição de composto orgânico. Na segunda coleta, foram isoladas 21 linhagens de levedura, sendo que 6 tiveram como origem o solo do cultivo de milho solteiro, 3 do cultivo de milho consorciado com crotalária, 10 isolados do solo sob cultivo de milho e guandu, e dois isolados do consórcio do milho com crotalária e guandu. Doze isolados foram obtidos do solo sem adição de composto orgânico, e 9 isolados do solo com composto orgânico.

Considerando as duas coletas, a amostra de solo de onde mais se isolou leveduras foi a sob cultivo de milho consorciado com guandu, sem adição de adubo orgânico (MGA), com 39% dos isolados, seguido da amostra de solo de milho solteiro com adubo orgânico (MP) com 21%.

Das amostras de solo de milho solteiro sem adubo orgânico (MA), milho consorciado com crotalária sem adubo orgânico (MCA) e com adubo orgânico (MCP) foram isolados 11% das leveduras cada. A amostra de solo sob cultivo de milho consorciado com guandu e crotalária, e com adubo orgânico (MGCP) forneceu 7%

dos isolados. Considerando apenas a adubação do solo, 61% dos isolados vieram de amostras que não receberam adição do composto orgânico, e 39% de amostras de solo com composto orgânico (Figura 4). Das amostras de solo sob cultivo de milho consorciado com guandu e adição de adubo orgânico (MGP), e do milho consorciado com guandu e crotalária sem adição de adubo orgânico (MGCA), nenhuma levedura foi isolada.

Figura 4. Proporção dos isolados de leveduras obtidos para cada tipo de solo de origem. MA (milho solteiro), MCA (milho + crotalária), MGA (milho + guandu), MCGA (milho + crotalária + guandu), MP (milho + composto orgânico), MCP (milho + crotalária + composto orgânico), MGP (milho + guandu + composto orgânico), MCGP (milho + crotalária + guandu + composto orgânico).



Fonte: Elaborado pela própria autora (2022).

A espécie vegetal tem papel fundamental em definir a composição da diversidade microbiana no solo, principalmente devido a liberação de exsudatos radiculares, os quais estimulam e alimentam os microrganismos próximos às suas raízes (SPAEPEN *et al.*, 2007). Na produção do milho, as espécies de crotalária e guandu são inseridas como adubo verde no sistema de produção, com o propósito de aumento da contribuição de nitrogênio no solo através da fixação biológica de nitrogênio atmosférico e aumento da matéria seca (TREVISAN *et al.*, 2019). Chieza *et al.* (2013) relatam que o consórcio de milho com guandu anão diminuiu a

densidade do solo, a macroporosidade e a porosidade total, com a manutenção dos agregados nos períodos amostrados, demonstrando que este consórcio tem potencial para melhorar os atributos físicos, químicos e biológicos, de forma que o sistema de consórcio atua principalmente como função de cobertura no solo. Com isso, reduz as amplitudes térmicas do solo, interceptando a radiação solar e diminuindo a evaporação de água, mantendo a umidade do solo e beneficiando os microrganismos ali presentes.

Trevisan *et al.* (2019), avaliando o cultivo de milho em consórcio na mesma área na safra 2017/2018, observaram que a amplitude da variação da temperatura do solo em função do horário e profundidade no consórcio de milho com guandu, não apresentou alterações significativas. Os autores concluem que o resultado é devido, principalmente, à maior produção de massa seca do consórcio MG (milho + guandu), se comparado às outras combinações (milho + crotalária e milho + crotalária + guandu). Além disso, a umidade do solo se manteve maior no consórcio de milho com guandu, o que pode promover uma maior quantidade e diversidade microbiana na área, favorecendo positivamente o isolamento de um número maior de leveduras desse consórcio.

O estágio de desenvolvimento do vegetal também pode afetar a composição dos exsudatos, promovendo assim alterações nas espécies microbianas do solo e rizosfera (SPAEPEN *et al.*, 2007). A primeira coleta foi realizada quando o milho estava no estágio de desenvolvimento V10, no qual há o desenvolvimento dos órgãos florais e o caule está se alongando. A planta de milho, nessa fase, inicia um crescimento contínuo acelerado, acumulando nutrientes e peso seco, o que ocasiona maior absorção de água e nutrientes (MAGALHÃES; DURÃES, 2006). Na segunda coleta, porém, o milho estava no estágio de desenvolvimento R6, no qual atingiu o seu estado de maturidade fisiológica. Os grãos presentes na espiga alcançam o máximo de peso seco e vigor. Nesta etapa inicia-se o processo de senescência natural das folhas, e assim, aos poucos, estas vão perdendo a cor verde (MAGALHÃES; DURÃES, 2006).

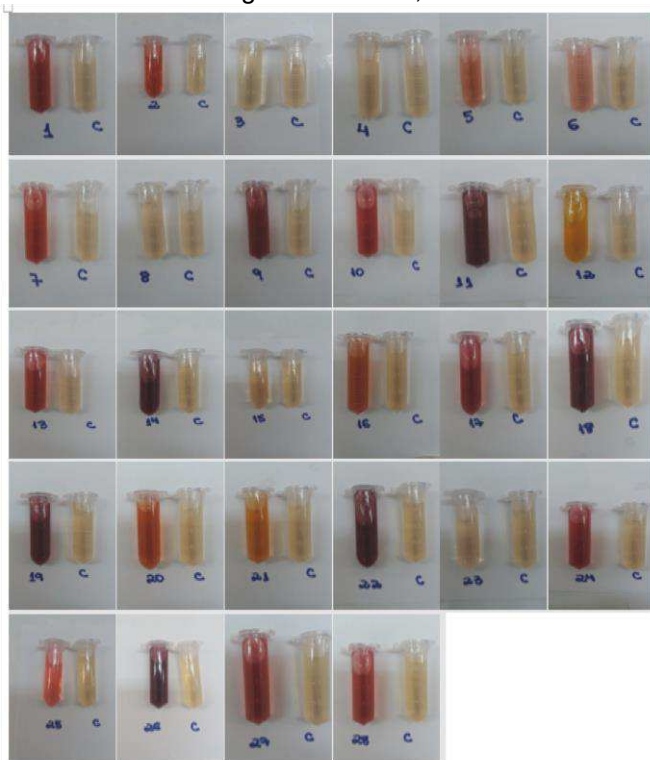
Nos estudos de Trevisan *et al.* (2019) a análise de umidade do solo ao longo do estágio fenológico do milho, nos diferentes tratamentos analisados, revelou que a umidade do solo no estágio V8 próximo ao V10 foi no MC (milho + crotalária) com 26,24%, seguido do milho solteiro com 25,84%. Este fato pode explicar o maior número de isolados encontrados nesse trabalho, na primeira coleta, em solos sob

milho solteiro (M) e no consórcio de milho com crotalária (MC), que juntos forneceram 86% dos isolados da primeira coleta. Também de acordo com Trevisan *et al.* (2019), a maior umidade de solo encontrada foi no tratamento MG (milho + guandu) com 26%, no estágio R6, no qual também foi encontrado o maior número de leveduras isoladas (48% do total dos isolados de leveduras da segunda coleta) em nosso trabalho. Entre os estádios R2 e R6, o milho tem pouca exigência de água por estar no processo de senescência e próximo da colheita. Os maiores valores de umidade foram observados em MG, pela maior cobertura do solo nesse tratamento, evitando assim a evaporação da água (TREVISAN *et al.*, 2019).

4.2. Produção de ácido indolacético (AIA)

Foram realizados testes qualitativos *in vitro* da capacidade de produção de AIA de todos os isolados de leveduras, ambos na presença de triptofano. No primeiro teste foi utilizado o meio de cultura YPD líquido, porém nenhuma linhagem de levedura apresentou resultado positivo, indicando que as leveduras não tiveram sucesso em produzir AIA nesse meio de cultura. Utilizando o meio de cultura BD, das 28 linhagens de levedura, 21 apresentaram resultado positivo de produção de AIA (82%). Segundo a escala de classificação (Figura 3), 11 linhagens apresentaram alta produção, 8 linhagens apresentaram média produção e 2 linhagens produziram pouco AIA (Figura 5).

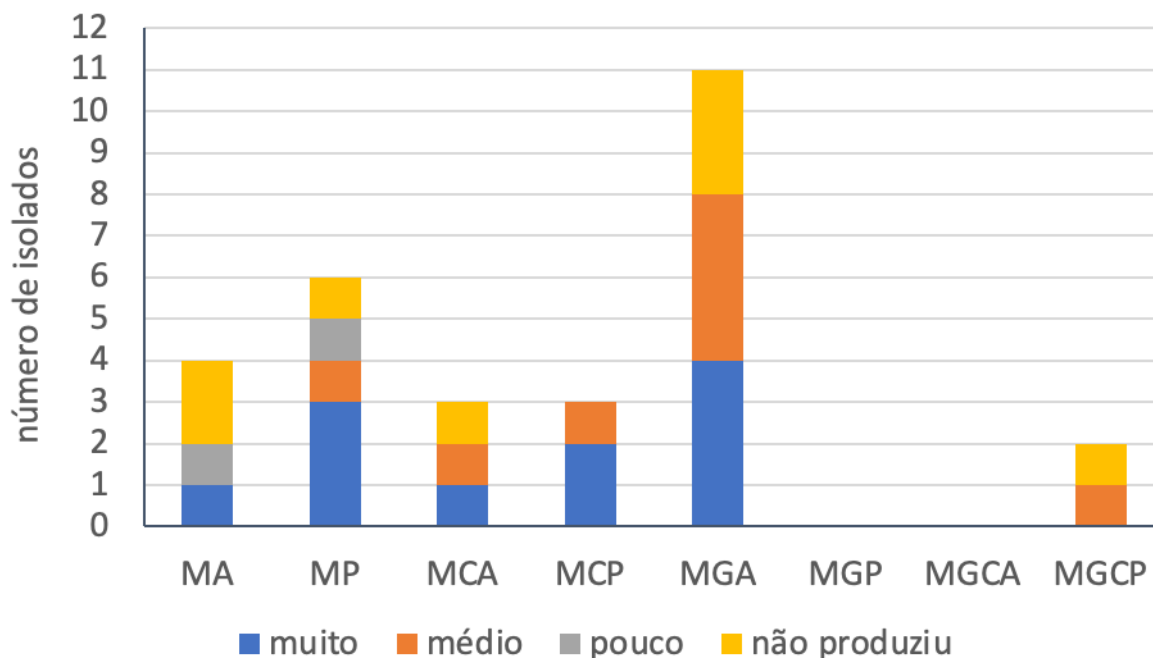
Figura 5. Reação do meio de cultivo das leveduras em meio BD com o reagente de Salkowsky. O número abaixo do microtubo indica a linhagem analisada, a letra C indica a reação controle.



Fonte: Elaborado pela própria autora (2022).

O tratamento MGA (milho + guandu) apresentou 8 isolados produtores de AIA, dentre eles, 4 linhagens produziram muito e 4 linhagens produziram de forma mediana. No tratamento MP (milho + composto orgânico), 5 isolados produziram AIA, sendo que 3 tiveram alta produção. Para o tratamento MCP (milho + crotalária + composto orgânico), as 3 linhagens apresentaram resultado positivo na produção de AIA, duas com alta produção. No tratamento MA (milho solteiro) 2 isolados produziram AIA, um deles pouco, e outro muito. No tratamento MCA (milho + crotalária) dois isolados produziram, um de forma mediana, e outro apresentou alta produção de AIA (Figura 6).

Figura 6. Distribuição de linhagens de leveduras produtoras de AIA isoladas nos diferentes tratamentos. MA (milho solteiro), MCA (milho + crotalária), MGA (milho + guandu), MCGA (milho + crotalária + guandu), MP (milho + composto orgânico), MCP (milho + crotalária + composto orgânico), MGP (milho + guandu + composto orgânico), MCGP (milho + crotalária + guandu + composto orgânico).



Fonte: Elaborado pela própria autora (2022).

A produção de AIA por microrganismos pode ser afetada pelo meio que proporciona seu crescimento. Trabalhos na literatura mostram que a fonte nutricional, o pH do meio, a temperatura e até o fornecimento de oxigênio podem afetar a produção do fitormônio pelos microrganismos. Scarcella *et al.* (2017) mostraram que a produção de AIA *in vitro* pelas espécies de levedura *Trichosporon asahii* e *Rhodotorula mucilaginosa* é drasticamente afetada pelo tipo de fonte de carbono, pelo pH do meio e por diferentes temperaturas de incubação. No presente trabalho, o meio YPD mostrou não fornecer as condições ideais (nutricionais e/ou pH) para a produção de AIA pelos isolados de levedura testados.

O AIA é um fitormônio essencial para a regulação do crescimento pelas plantas, além de estar envolvido nos processos fisiológicos, os quais inclui o alongamento e a divisão das células vegetais, germinação das sementes, desenvolvimento vascular e crescimento radicular (LUO *et al.*, 2018). As leveduras que produzem AIA podem contribuir para o aumento da formação das raízes laterais e dos pelos radiculares, para assim facilitar a captação dos nutrientes do solo pelas plantas (FU *et al.*, 2016; MILLAN *et al.*, 2020). A síntese de AIA é uma característica

que tem sido observada com frequência entre as leveduras (FU *et al.*, 2016). A capacidade das leveduras de produzir AIA está relacionada com as fontes de nutrientes, pH e das condições de cultivo (MILLAN *et al.*, 2020), corroborando com resultados aqui apresentados.

No trabalho de MILLAN *et al.* (2020), foram analisadas 69 cepas de leveduras cultivadas em meio com a presença e ausência de triptofano, para a produção de AIA. Os resultados mostraram que algumas linhagens são capazes de produzir AIA sem triptofano, em uma via independente do aminoácido. Com a adição de triptofano, porém, a via é mais eficiente para a maioria dos isolados. Os mesmos autores relatam que a capacidade das leveduras de produzir AIA é uma característica dependente da cepa e não da espécie (FU *et al.*, 2016). Fu *et al.* (2016), Freimoser *et al.* (2019) e Millan *et al.* (2020) corroboram que a levedura pode ter outro mecanismo para sintetizar AIA que não seja dependente de triptofano, sendo que a disponibilidade de triptofano pode afetar a produção de AIA pela levedura.

Os experimentos de Xin *et al.* (2009), avaliando três espécies de leveduras endofíticas isoladas de *Populus*, apresentaram resultados significativos para a produção de AIA, sendo que WP1 produziu 39 mg/mL, seguido de PTD2 18 mg/mL e PTD3 8 mg/mL. Nassar *et al.* (2005) mostraram que do total de 24 leveduras endofíticas isoladas de milho, 8 isolados apresentaram produção de AIA na presença e na ausência de triptofano.

4.3. Solubilização de fosfato

Do total de 28 isolados avaliados, 23 foram capazes de solubilizar fosfato tricálcico em meio sólido. Do total de isolados que solubilizaram, 15 apresentaram baixo índice de solubilização (IS) e 8 linhagens foram classificadas com médio IS. Nenhum isolado de levedura apresentou IS alto. As linhagens de leveduras que tem capacidade de solubilização de fosfato desenvolveram um halo translúcido ao redor das colônias, como ilustrado na Figura 7.

Figura 7. Solubilização de fosfato tricálcico com a formação de halo translúcido visível ao redor das colônias de leveduras.

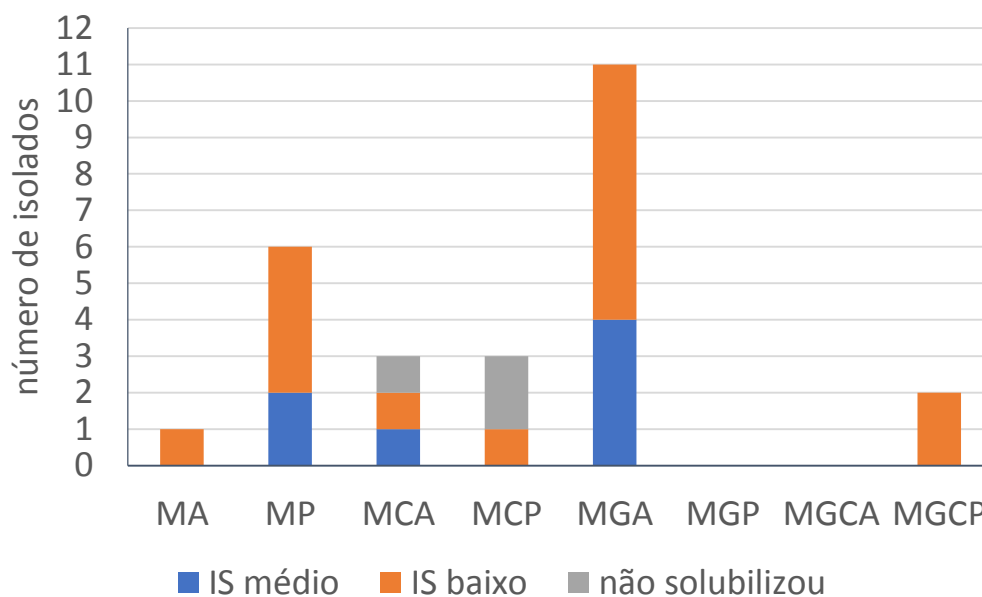


Fonte: Elaborado pela própria autora (2022).

Dentre as linhagens que apresentaram capacidade de solubilizar fosfato, 11 são de origem do milho em consórcio com guandu (MGA), das quais 4 apresentaram IS médio. O consórcio de milho com adubo orgânico (MP) forneceu 6 linhagens solubilizadoras, duas das quais com IS médio. Foram encontradas duas linhagens solubilizadoras do tratamento de milho consorciado com crotalária (MCA) e duas linhagens do tratamento milho consorciado com guandu e crotalária com adubo orgânico (MGCP). Os tratamentos de milho com adubo orgânico (MA) e milho crotalária e adubo orgânico forneceram uma linhagem solubilizadora cada, sendo o último com IS médio (Figura 8).

A solubilização de fosfato é uma das características mais importantes dos microrganismos empregados na biofertilização, considerando que o fosfato insolúvel presente no solo não pode ser utilizado pelas plantas (SHARMA *et al.*, 2013; MILLAN *et al.*, 2020). Grande parte dos fertilizantes fosfatados solúveis usualmente utilizados na agricultura são imobilizados no solo, o que os tornam indisponíveis para as plantas, causando deficiência de fósforo nas culturas. Para evitar esse problema e poder suprir a planta do nutriente, são utilizadas grandes quantidades de fertilizantes, ocasionando grande impacto ambiental e alto custo na produção vegetal (SHARMA *et al.*, 2013; MILLAN *et al.*, 2020). Os microrganismos solubilizadores de fosfatos no solo atuam no processo solubilizando o fósforo e tornando o nutriente disponível para as plantas. A solubilização ocorre principalmente pela produção de ácidos orgânicos pelos microrganismos do solo (SHARMA *et al.*, 2013).

Figura 8. Índice de solubilização (IS) de fosfato observado pelas linhagens de leveduras isoladas. MA (milho solteiro), MCA (milho + crotalária), MGA (milho + guandu), MCGA (milho + crotalária + guandu), MP (milho + composto orgânico), MCP (milho + crotalária + composto orgânico), MGP (milho + guandu + composto orgânico), MCGP (milho + crotalária + guandu + composto orgânico).



Fonte: Elaborado pela própria autora (2022).

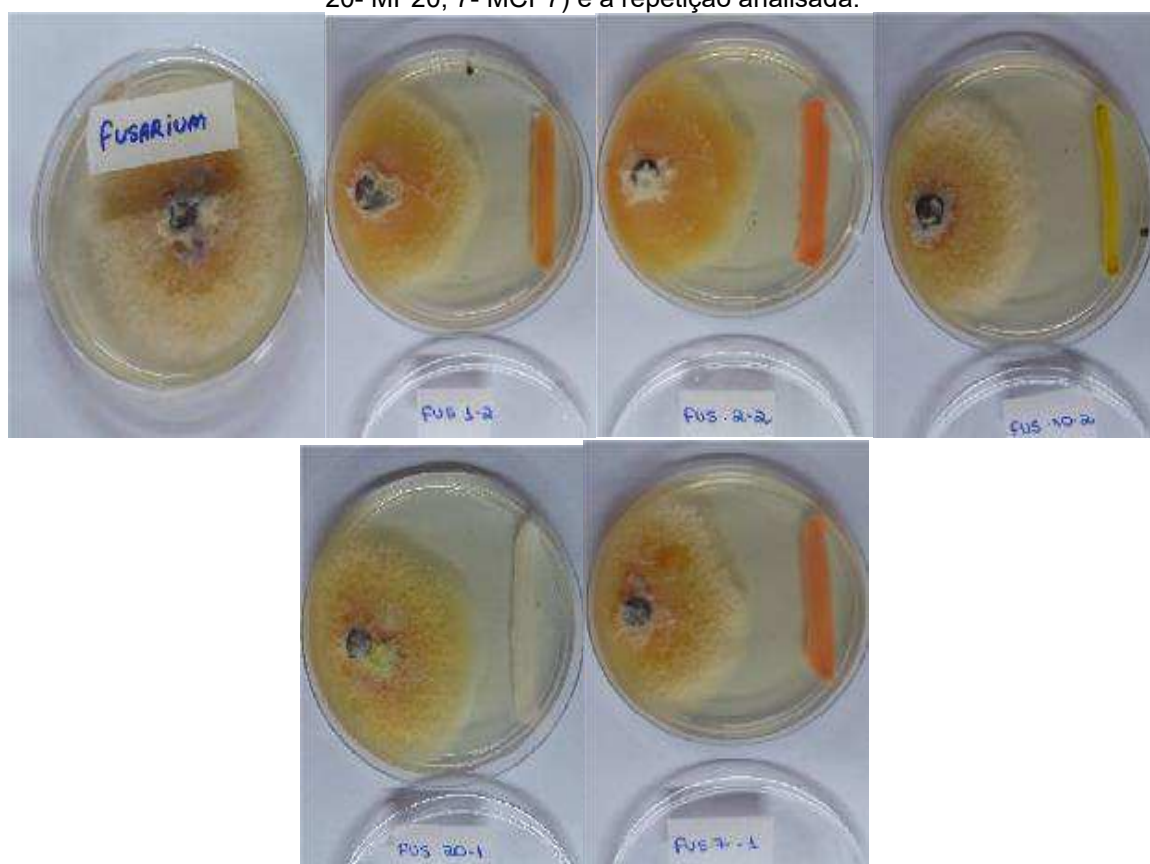
Os isolados que apresentaram os maiores IS (IS médio) foram as linhagens MGA9 (IS=3,8), MP18 (IS=2,63) e MGA14 (IS=2,3). Os isolados que apresentaram os menores valores de IS (IS baixo) foram MGA12 (IS=1,33), MP21 (IS= 1,33), MCA2 (IS=1,5) e MGA15 (IS=1,5). Diferenças nos halos de solubilização podem ocorrer devido à própria linhagem de levedura, devido à estrutura química, massa molar ou à velocidade de difusão dos metabólitos microbianos (ácidos orgânicos) no meio de cultura (BLANCO-VARGAS *et al.*, 2020).

Blanco-Vargas *et al.* (2020) demonstraram que as bactérias *Serratia sp.* e *Pseudomonas sp.* afetam diretamente a germinação de sementes e o crescimento das plantas, contribuindo com a disponibilidade de nutrientes (fósforo) através da produção de ácidos orgânicos. Nutaratat *et al.* (2014) avaliaram várias espécies de levedura, e apenas a levedura *Torulaspota globosa* (DMKU-RP31) conseguiu solubilizar fosfato de cálcio *in vitro*, apresentando IS de 1,22. No trabalho de Fu *et al.* (2016), ao avaliarem isolados da superfície de folhas e rizosfera da planta *Drosera spatulata*, encontraram 18 linhagens capazes de solubilizar fosfato dicálcico, 29 linhagens com capacidade de solubilizar o fosfato de cálcio tribásico e 2 linhagens (*Saccharomyces cerevisiae* e *Torulaspota sp.*) que solubilizaram o fosfato tricálcico em meio Pikovskaya.

4.4. Avaliação do antagonismo das leveduras contra fungos fitopatogênicos

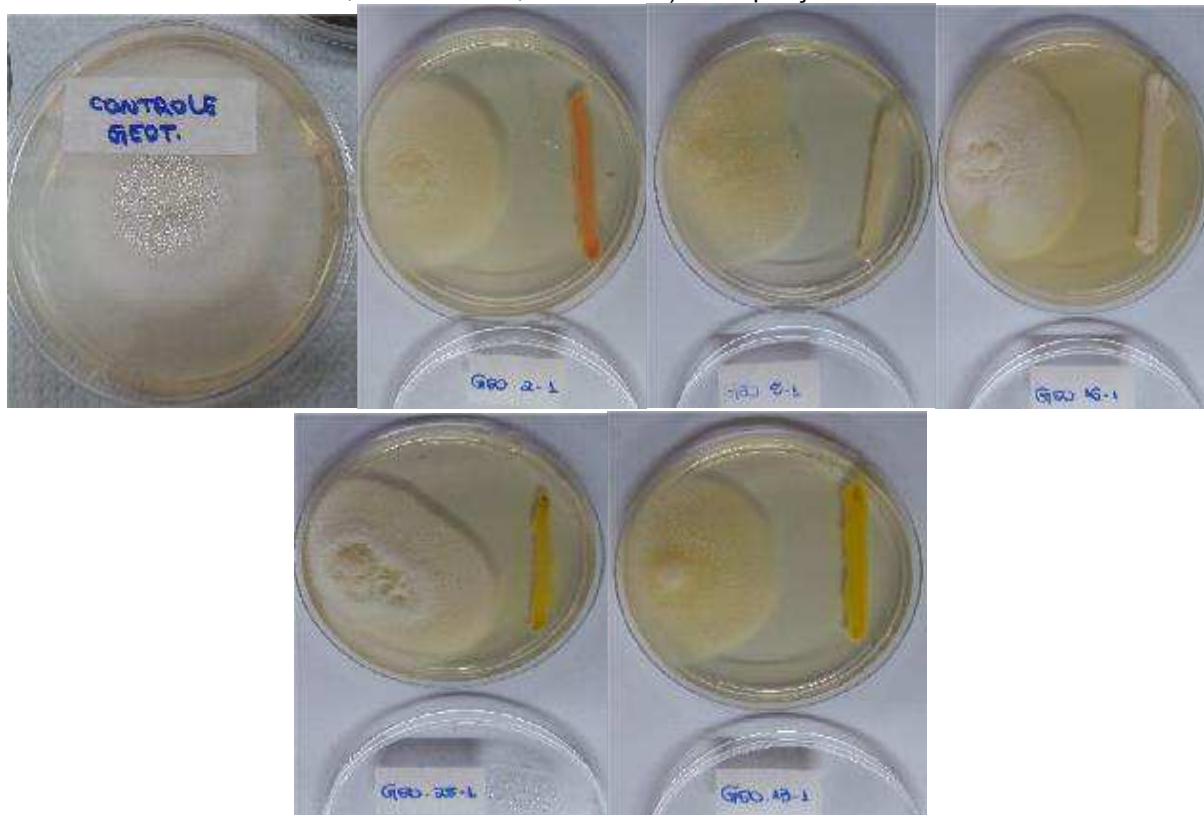
Os isolados de leveduras foram testados quanto ao seu potencial antagônico aos fungos fitopatogênicos *Fusarium verticillioides* (Figura 9) e *Geotrichum candidum* (Figura 10). Todas as linhagens de leveduras avaliadas exibiram ação antagônica contra os fungos fitopatogênicos, promovendo a redução do desenvolvimento micelial fúngico se comparado ao controle.

Figura 9. Inibição *in vitro* do crescimento do fitopatógeno *F. verticillioides* (FUS) pelas linhagens isoladas de leveduras. Primeira foto da linha de cima à esquerda ilustra a placa controle. Demais placas apresentam cultivo pareado com identificação do número (1 – MCA1; 2- MCA2; 10- MGA10; 20- MP20; 7- MCP7) e a repetição analisada.



Fonte: Elaborado pela própria autora (2022).

Figura 10. Inibição *in vitro* do crescimento do fitopatógeno *G. candidum* (GEO) pelas linhagens isoladas de leveduras. Primeira foto da linha de cima à esquerda ilustra a placa controle. Demais placas apresentam cultivo pareado com identificação do número da linhagem (2- MCA2; 5- MA5; 16- MGA16; 25- MGCP25; 13- MGA13) e a repetição analisada.



Fonte: Elaborado pela própria autora (2022).

Os microrganismos antagonistas podem agir devido à competição por espaço e nutriente, pela produção de toxinas, enzimas hidrolíticas e compostos orgânicos voláteis, e parasitismo (FREIMOSER *et al.*, 2019). Assim, testes adicionais são necessários para saber qual desses mecanismos as leveduras apresentam e que lhe possibilitam a atuação como antagonistas desses fitopatógenos.

As leveduras são interessantes para o emprego no controle biológico porque são consideradas atóxicas, ou seja, a maioria não apresenta risco à saúde dos seres humanos e animais. Por isso apresentam vantagem em comparação às bactérias e fungos filamentosos principalmente considerando seu emprego em produtos consumidos *in natura*. Além disso, as leveduras são pouco exigentes quanto à nutrição, podem crescer em diversas fontes de carbono, podem colonizar ambientes secos e sobreviver desta forma por um grande período, além de proporcionar altos valores de biomassa em um pequeno espaço de tempo (GASPERINI *et al.*, 2011).

A maioria dos trabalhos sobre controle biológico pelas leveduras está relacionada ao controle de fitopatógenos de pós-colheita (principalmente em frutos)

ou no controle de doenças foliares. São escassos os trabalhos de levedura no controle de fitopatógenos de solo (MOREIRA, 2019).

Vários organismos e células, tanto em humanos quanto em microrganismos, sintetizam as moléculas chamadas de sideróforos, que se ligam ao ferro, elemento essencial, para impedir que seus adversários tenham acesso ao elemento. Essa competição pelo ferro é empregada como um modo de ação pelas leveduras de biocontrole (SPADARO; DROBY, 2016). A secreção de enzimas (quitinases, glucanases ou proteases) que degradam os componentes celulares fúngicos também pode ser um mecanismo utilizado no controle dos fungos pelas leveduras antagonistas (FREIMOSER *et al.*, 2019).

O trabalho de Gore-Lloyd *et al.* (2019) demonstrou que com a privação do ferro do patógeno pela produção dos sideróforos, a atividade fúngica é reduzida, e a levedura *Metschnikowia pulcherrima* consegue exercer a ação antagônica nos fungos patogênicos. O mesmo trabalho porém evidencia que os mutantes que não possuem a capacidade de sintetizar o ácido pulcherrímico (sideróforo) inibiram os fungos filamentosos, mostrando que é não apenas a privação do ferro que garante a ação antifúngica. Estudos envolvendo o biocontrole de leveduras e os quelantes de ferro ainda precisam ser mais estudados (FREIMOSER *et al.*, 2019).

A avaliação *in vitro* de 13 isolados de levedura que apresentaram altos índices de AIA, e a capacidade antagônica contra os fungos de arroz (*Fusarium moniliforme*, *Helminthosporium oryzae* e *Rhizoctonia solani*), mostrou que apenas a levedura *T. globosa* (DMKU-RP31) apresentou antagonismo contra os três fitopatógenos, com isso, propuseram que a cepa pode ser usada de duas maneiras, aumentando o crescimento da planta e como agente de biocontrole (NUTARATAT *et al.*, 2014). A levedura *T. globosa* (DMKU-RP31) mostrou capacidade de produzir compostos voláteis e efeito antagonista contra os fitopatógenos testados em meio sólido, mas são necessárias outras características indiretas para promover o aumento do crescimento das plantas (NUTARATAT *et al.*, 2014).

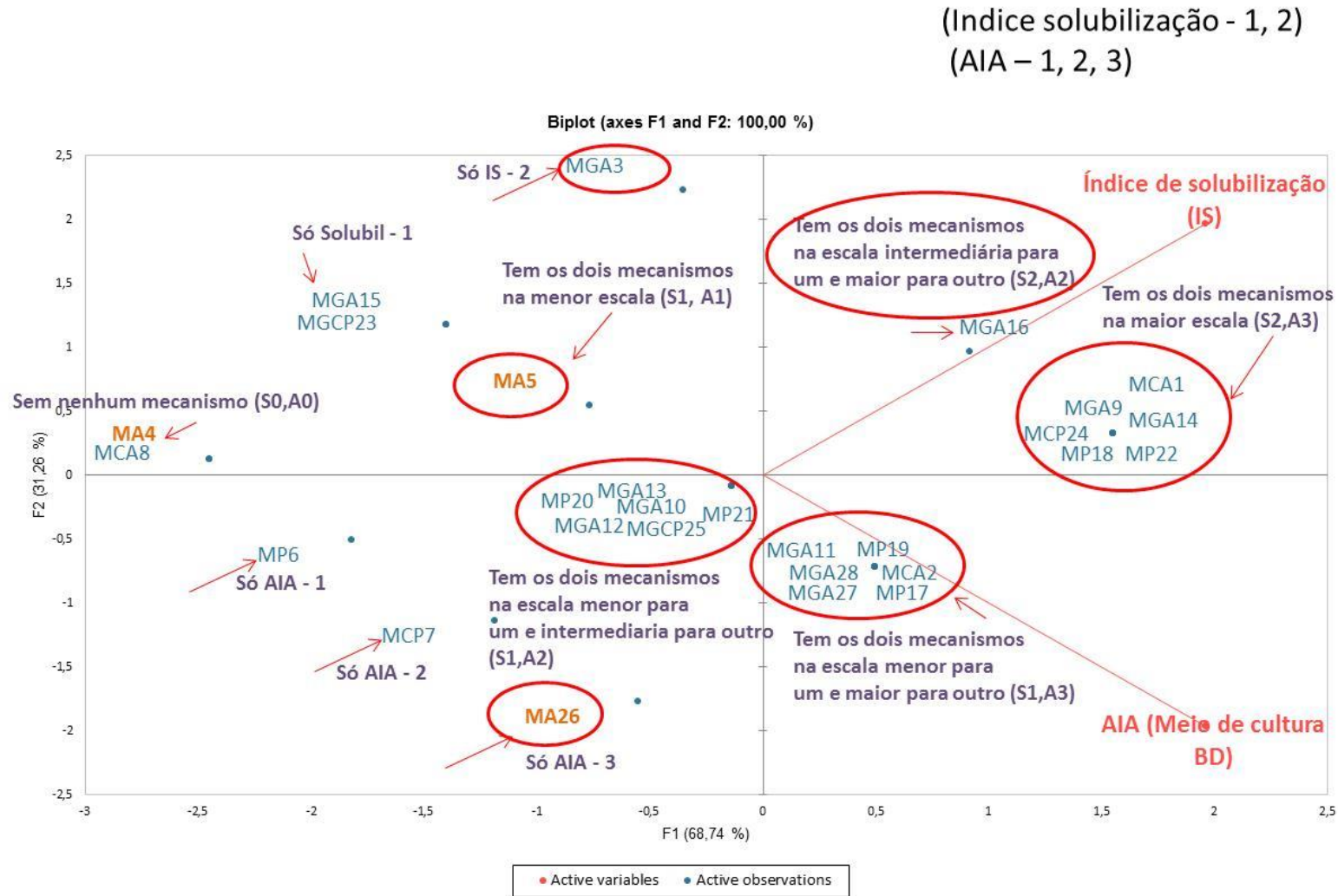
4.5. Análise de Componente Principal

Para a análise de componente principal (PCA), os resultados de AIA em YPD e a ação antagonista das leveduras contra os fitopatógenos foram desconsideradas por apresentarem o mesmo resultado (sem variação) para todas as leveduras isoladas. Foram consideradas então, a produção de AIA em caldo BD e a

solubilização de fosfato, utilizando para isso, a análise multivariada que transforma as variáveis originais em um novo grupo com a mesma dimensão, que são os componentes principais, que podem ou não estar correlacionadas entre si (HONGYU *et al.*, 2015). O conjunto dos mecanismos para a análise de componente principal gerou um gráfico *biplot* (Figura11).

Os componentes F1 e F2 explicaram 100% da variabilidade total dos resultados, mostrando um agrupamento com 20 isolados com os dois mecanismos e 8 isolados sem mecanismo ou com apenas um. O agrupamento com as leveduras MCA1, MGA9, MGA14, MP18, MP22, MCP24 tem a mesma variável resposta, possuindo os dois mecanismos na maior escala, sendo AIA (3) e IS (2). A levedura MGA16 tem os dois mecanismos, sendo AIA na escala intermediária (2) e maior para IS (2). O agrupamento com as leveduras MCA2, MGA11, MP17, MP19, MGA27 e MGA28 têm os dois mecanismos, na escala menor para IS (1) e maior para AIA (3). O agrupamento com MGA10, MGA12, MGA13, MP20, MP21 e MGCP25, têm os dois mecanismos, na escala menor para IS (1) e intermediária para AIA (2), e a levedura MA5 tem os dois mecanismos na menor escala AIA (1) e IS (1). As leveduras que estão isoladas representam aquelas que não possuem os mecanismos ou apenas um, sendo AIA ou solubilização (MA26 tem um mecanismo AIA (3); MCP7 tem um mecanismo AIA (2); MP6 tem um mecanismo AIA (1); MGA3 tem um mecanismo IS (2); MGA15 e MGCP23 tem um mecanismo IS (1); MA4 e MCA8 não tem os dois mecanismos). Considerando os resultados obtidos neste trabalho, a Figura 11 apresenta um resumo geral com todos os dados a partir da avaliação dos mecanismos de promoção de crescimento vegetal. É possível, nesta etapa, destacar 6 linhagens, que apresentam os melhores resultados: MCA1, MGA9, MGA14, MP18, MP22 e MCP24. Essas linhagens apresentaram alta produção de AIA e médio IS.

Figura 11. Análise de Componente Principal das leveduras isoladas e os mecanismos de promoção de crescimento vegetal, indicado nos vetores, onde os círculos representam os agrupamentos dos isolados com dois mecanismos.



Fonte: Elaborado por TOSTA, C. D. e própria autora (2022).

4.6. Caracterização e seleção dos isolados de leveduras com potencial para promoção de crescimento vegetal

A escolha das linhagens para a continuação do trabalho foi baseada na caracterização fenotípica das leveduras, com avaliação da colônia em meio sólido YPD, do formato das células em microscópio, além da curva de crescimento em meio de cultura YPD e em melação de cana-de-açúcar.

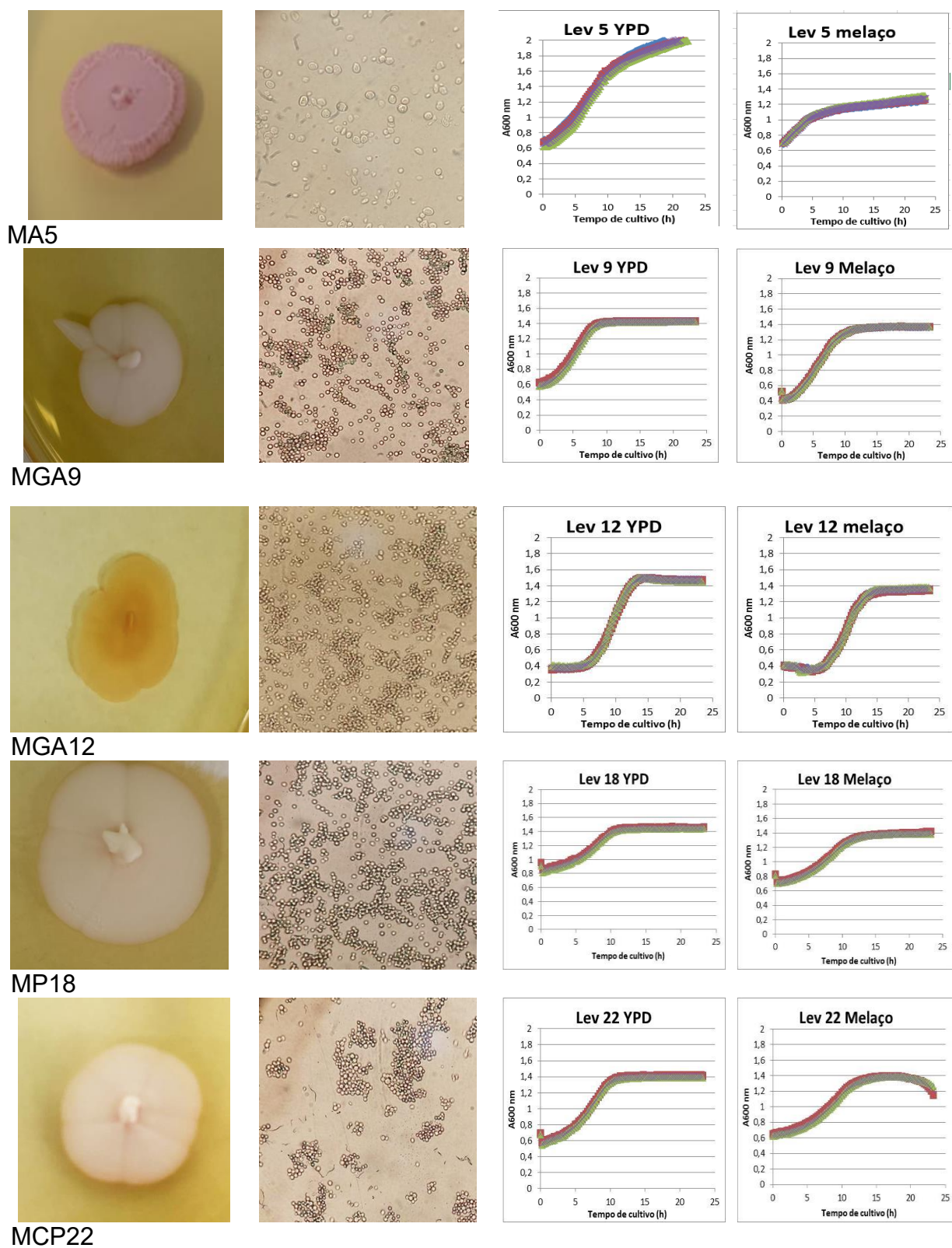
O emprego de subprodutos da indústria como meio de cultivo microbiano é uma alternativa interessante para substituir meios de cultura sintéticos, que podem ser caros e, por isso, tornar inviável o cultivo do microrganismo em larga escala (BRINGHENTI *et al.*, 2007). O melação de cana-de-açúcar, um subproduto da agroindústria canavieira, apresenta baixo custo para emprego como meio de cultivo para microrganismos, e pode ser uma alternativa para a produção de moléculas microbianas de interesse. Por isso, foi utilizado como parâmetro de seleção das linhagens a capacidade destas em se desenvolver em meio de melação, comparado ao desenvolvimento em meio YPD.

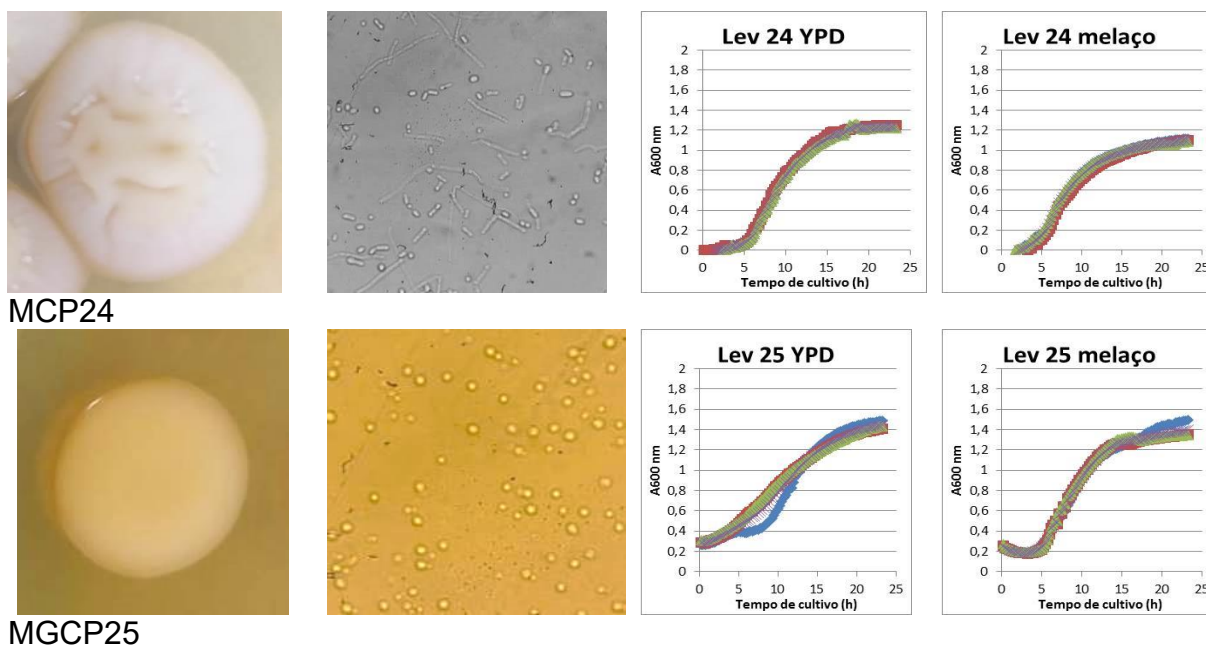
A partir dos resultados obtidos nessas análises, foi possível agrupar as linhagens de leveduras que apresentavam semelhanças fenotípicas. No grupo 1, as linhagens de leveduras MGA9, MGA11, MGA14, MGA16, MP17, MP18, MP20, MP21 e MCP22 apresentam semelhança na forma da colônia, formato e tamanho de célula, além do perfil de crescimento. As linhagens que apresentaram os melhores resultados para os dois mecanismos de promoção de crescimento (AIA e solubilização), e foram isoladas de diferentes tratamentos de solo foram selecionadas (MGA9, MP18 e MCP22).

O grupo 2 apresenta as linhagens de leveduras que não se enquadraram no grupo 1 (MA5, MGA12, MP19, MCP24, MGCP25). Todas se assemelham apenas pelo fato de apresentarem os dois mecanismos (produção de AIA e solubilização de P). A linhagem MP19 não foi selecionada para continuar os testes, pois apesar do tipo de crescimento ser diferente das demais, tem uma fase lag muito longa. A linhagem MCA1, que se destacou nos testes iniciais, não foi analisada fenotipicamente pois não permaneceu viável após armazenamento nas condições propostas (em YPD e geladeira).

Ao final do processo de seleção, foram selecionadas sete linhagens para serem avaliadas nos testes futuros, sendo elas MGA9, MP18, MCP22, MA5, MGA12, MCP24 e MGCP25 (Figura 12).

Figura 12. Caracterização fenotípica das linhagens de leveduras selecionadas com potencial para promoção de crescimento vegetal. Aspecto da colônia, morfologia das células em aumento de 400x em microscópio óptico, e curvas de crescimento em meio YPD e melão.





Fonte: Elaborado pela própria autora (2022).

As linhagens selecionadas foram avaliadas por meio do sequenciamento do domínio D1/D2 do gene 26S do rDNA, para identificação das espécies. O resultado do alinhamento das sequências obtidas com as do banco de genes do NCBI, indicaram as espécies mais prováveis para cada linhagem (Tabela 1).

Tabela 1. Identificação das linhagens de leveduras selecionadas pelo sequenciamento do domínio D1/D2 do gene 26S do rDNA.

| Linhagem | Espécie com maior similaridade | Tamanho do fragmento (pb) | Similaridade | Acesso (GenBank) |
|----------|----------------------------------|---------------------------|--------------|------------------|
| MA5 | <i>Aureobasidium melanogenum</i> | 910 | 99% | MH875142.1 |
| MGA9 | <i>Torulaspota delbrueckii</i> | 928 | 98% | HE660065.1 |
| MGA12 | <i>Candida pseudointermedia</i> | 2449 | 99% | MK394147.1 |
| MP18 | <i>Torulaspota globosa</i> | 914 | 99% | KY109864.1 |
| MCP22 | <i>Torulaspota delbrueckii</i> | 929 | 98% | HE660065.1 |
| MCP24 | <i>Trichosporon asahii</i> | 646 | 99% | FJ463646.1 |
| MGCP25 | <i>Cryptococcus laurentii</i> | 627 | 99% | AM931019.1 |

5. Conclusões

Foram isoladas 28 linhagens de leveduras das amostras de solo sob cultivo de milho nos diferentes tratamentos (consorciado ou não, adubado com composto orgânico ou não). No geral, 39% das leveduras isoladas são do tratamento MGA, seguido pelo tratamento MP com 21%, os tratamentos MA, MCA e MCP com 11% em cada, e por último o tratamento MGCP com apenas 7% dos isolados. Do total de leveduras isoladas, 23 linhagens (82%) apresentaram resultados positivos para os três mecanismos de promoção de crescimento vegetal testados.

As linhagens selecionadas após os testes iniciais e a caracterização fenotípica, foram as linhagens MGA9 (*Torulaspota delbrueckii*), MP18 (*Torulaspota globosa*), MCP22 (*Torulaspota delbrueckii*), MA5 (*Aureobasidium melanogenum*), MGA12 (*Candida pseudointermedia*), MCP24 (*Trichosporon asahii*) e MGCP25 (*Cryptococcus laurentii*).

Os efeitos combinados dos mecanismos de promoção, seja de ação direta, como a solubilização de fosfato e a produção de AIA, e de ação indireta, como o controle de fitopatógenos, são convenientes para favorecer o crescimento da planta. Esses efeitos combinados nas linhagens de leveduras podem favorecer o aumento da produtividade da cultura e proporcionar maior economia para os agricultores.

6. Literatura citada

BEHBAHANI, B. A.; YAZDI, F. T.; SHAHIDI, F.; MORTAZAVI, S. A.; MOHEBBI, M. Principal component analysis (PCA) for investigation of relationship between population dynamics of microbial pathogenesis, chemical and sensory characteristics in beef slices containing Tarragon essential oil. **Microbial Pathogenesis**, v. 105, p. 37-50, 2017.

BHARUCHA, U.; PATEL, K.; TRIVEDI, U. B. Optimization of índole acetic production by *Pseudomonas putida* UB1 and its effect as plant growth-promoting rhizobacteria on Mustard (*Brassica nigra*). **Agricultural Research**, v. 2, n. 3, p. 215-221, 2013.

BLANCO-VARGAS, A. B.; RODRÍGUES-GACHA, L. M.; SANCHEZ-CASTRO, N.; GRAZONJARAMILO, R.; PEDROZA-CAMACHO, L. D.; POUTOU-PIN, R. A.; RIVERA-HOYOS, C. M.; DÍAZ-ARIZA, L. A.; PEDROZA-RODRÍGUEZ, A. M. Phosphate-solubilizing *Pseudomonas sp.*, and *Serratia sp.*, co-culture for *Allium cepa* L. growth promotion. **Heliyon**, v. 6, e05218, 2020.

BRIC, J.; BOSTOCK, R. M.; SILVERSTONE, S. E. Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 535-538, 1991.

BRINGHENTI, L.; CABELLO, C.; URBANO, L. Fermentação alcoólica de substrato amiláceo e hidrolisado enriquecido com melão de cana. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 2, p. 429-432, 2007.

BOTHA, A. The importance and ecology of yeasts in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, p. 4-8, 2011.

CHIEZA, E. D.; LOVATO, T.; ARAÚJO, E. da S.; TONIN, J. Propriedades físicas do solo em área sob milho em monocultivo ou consorciado com leguminosas de verão. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 37, p. 1393-1401, 2013.

FREIMOSER, F. M.; RUEDA-MEJIA, M. P.; TILOCCA, B.; MIGHELI, Q. Biocontrol yeasts: mechanisms and applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 154, 2019.

FREITAS, J. R.; BANERJEE, M. R.; GERMIDA, J. J. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). **Biology and Fertility of Soils**, v. 24, p. 358-364, 1997.

FU, S. F.; SUN, P. F.; LU, H. Y.; WEI, J. Y.; XIA, O. H. S.; FANG, W. T.; CHENG, 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.

GASPERINI, A. M.; HASHIMOTO, E. H.; COELHO, A. R.; HIROOKA, E. Y. Leveduras *killer* visando o biocontrole de *Fusarium verticillioides* micotoxigênico para a qualidade de milho. In: III Encontro Paranaense de Engenharia de Alimentos, 2011.

GIRI, R.; SHARMA, R. K. Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass for the production of plant hormone by *Pichia fermentans* under submerged conditions. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 7, p. 1-11, 2020.

GORDON, S. A.; WEBER, R. P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**, v. 26, p. 192-195, 1951.

GORE-LLOYD, D.; SUMANN, I.; BRACHMANN, A. O.; SCHNEEBERGER, K.; ORTIZ-MERINO, R. A.; MORENO-BELTRÁN, M.; SCHLAFLI, M.; KIRNER, P.; KRON, A. S.; RUEDA-MEJIA, M. P.; SOMERVILLE, V.; WOLFE, K. H.; PIEL, J.; AHRENS, C. H.; HENK, D.; FREIMOSER, F. M. Snf2 controls pulcherriminic acid biosynthesis and antifungal activity of the biocontrol yeast *Metschnikowia pulcherrima*. **Molecular Microbiology**, v. 112, p. 317-332, 2019.

HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; CORDERO-BUESO, G.; RUIZ-MUÑOZ, M.; CANTORAL, J. M. Culturable yeasts as biofertilizers and biopesticides for a sustainable agriculture: a comprehensive review. **Plants**, v. 10, p. 822, 2021.

HONGYU, K.; SANDANIELO, V. L. M.; OLIVEIRA JUNIOR, G. J. de. Análise de Componentes Principais: resumo teórico, aplicação e interpretação. **Engineering and Science**, v. 1, p. 83-90, 2015.

IGNATOVA, L. V.; BRAZHNIKOVA, Y. V.; BERZHANOVA, R. Z.; MUKASHEVA, T. D. Plant growth promotion and antifungal activity of yeasts from dark chestnut soil. **Microbiological Research**, v. 175, p. 78-83, 2015.

KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; AHMAD, E. Mechanism of phosphate solubilization and physiological functions of phosphate-solubilizing microorganisms. *In*: KHAN, M.; ZAIDI, A.; MUSARRAT, J. (eds). **Phosphate solubilizing microorganisms: principles and application of microphos technology**. Springer International Publishing, p. 31-62, 2014.

KÖPPEN, W. **Climatologia: conunestudio de los climas de latierra**. México: Fondo de Cultura Economica, 1948. 478 p.

LUO, J.; ZHOU, J. J.; ZHANG, J. Z. Aux/IAA gene Family in plants: molecular structure, regulation, and function. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, p. 259, 2018.

MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M. **Fisiologia da produção de milho**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006, 10 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Comunicado Técnico, 76).

MILLAN, A. F. S.; FARRAN, I.; LARRAYA, L.; ANCIN, M.; ARREGUI, L. M.; VERAMENDI, J. Plant growth-promoting traits of yeasts isolated from Spanish vineyards: benefits for seedling development. **Microbiological Research**, v. 237, e. 126480, 2020.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n.3, p. 426-428, 1959.

MOREIRA, G. A. M. **Diversidade e ecologia de leveduras em solos brasileiros**. 2019. 186 p. Tese (Doutorado de Biologia Microbiana), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília – UnB, Brasília, 2019.

NASSAR, A. H.; EL-TARABILY, K. A.; SIVASITHAMPARAM, K. Promotion of plant growth by an auxin producing isolate of the yeast *Williopsis saturnus* endophytic in maize (*Zea mays* L.) roots. **Biology and Fertility of Soils**, v. 42, p. 97-108, 2005.

NEDER, R. N. **Microbiologia: manual de laboratório**. Nobel, 1992.

NUTARATAT, P.; SRISUK, N.; ARUNRATTIYAKORN, P.; LIMTONG, S. Plant growth promoting traits of epiphytic and endophytic yeasts isolated from rice and sugar cane leaves in Thailand. **Fungal Biology**, v. 118, p. 683-94, 2014.

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.

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.

SHARMA, S.; SAYYED, R.; TRIVEDI, M.; GOBI, T. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. **Springer Plus**, v. 2, p. 1-14, 2013.

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

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

TREVISAN, M. **Atributos do solo em sistemas consorciados de milho com adubos verdes sob manejo orgânico**. 2019. Dissertação (Mestrado em Agroecologia e Desenvolvimento Rural), Universidade Federal de São Carlos, Araras, SP, 2019.

XIN, G.; GLAWE, D.; DOTY, S. L. Characterization of three endophytic, indole-3-acetic acid producing yeasts occurring in *Populus* trees. **Mycological Research**, v. 3, p. 973-980, 2009.

YOSHIDA, F. A.; STOLF, R. Mapeamento digital de atributos e classes de solos da UFSCar – Araras/SP. **Ciência, Tecnologia & Ambiente**, v. 3, n. 1, p. 1-11, 2016.

YURKOV, A. M. Yeasts of the soil - obscure but precious. **Yeast**, v. 35, p. 369-78, 2018.

CAPÍTULO 2. Avaliação das leveduras selecionadas quanto a produção de AIA e solubilização de fosfato *in vitro*

1. Resumo

Microrganismos promotores de crescimento vegetal apresentam diferentes mecanismos que beneficiam as plantas, dentre eles, a produção de ácido indolacético (AIA), molécula similar ao fitormônio de crescimento auxina e a solubilização de fosfatos, importante para a disponibilização do nutriente para as plantas, promovendo incremento à nutrição vegetal. Considerando o exposto, o objetivo desse trabalho foi avaliar linhagens de leveduras isoladas de solo quanto à produção de AIA e solubilização de fosfato tricálcico *in vitro*. A quantificação da produção de AIA foi avaliada em meio de cultura caldo de batata (BD) e em meio de melão clarificado (20 g/L de ART), complementado ou não com triptofano, pela metodologia colorimétrica com reagente de Salkowsky. Para a determinação da solubilização de fosfato foram utilizados o meio de cultura NBRIP e meio de melão clarificado (20 g/L de ART), e a quantificação do fósforo solúvel pela metodologia colorimétrica do azul de molibdênio. Os resultados obtidos mostraram a produção de AIA pelas leveduras utilizando os dois meios testados (BD e melão). As linhagens MCP22 (milho + crotalária + composto) e MGA9 (milho + guandu), ambas *T. delbrueckii*, se destacaram quanto à produtividade de AIA em meio BD, com o pico de produção obtido em 24 horas de cultivo. Os melhores resultados de produtividade em melão também são com essas duas linhagens, com pico de produção após 24 horas para MCP22, e 48 horas para MGA9. Os ensaios de solubilização mostraram que para todas as linhagens avaliadas, o meio de cultura NBRIP ofereceu as melhores condições para a solubilização do fosfato tricálcico do que o melão, exceção para a linhagem MA5 que não solubilizou o fósforo nas condições testadas. É possível concluir que dentre as linhagens de leveduras avaliadas, as linhagens da espécie *T. delbrueckii* se destacam para ambos os mecanismos testados, e apresentam significativo potencial para o emprego em produtos biológicos para emprego na agricultura. O melão como meio de cultura acessível de baixo custo é viável apenas para a produção de AIA, pois apresenta fósforo solúvel em sua composição, causando interferência na solubilização de fosfato pelas leveduras.

2. Introdução

Os hormônios vegetais ou fitormônios são reguladores naturais de crescimento vegetal, essenciais nas funções de diferenciação do xilema e floema e estão presentes nos processos fisiológicos. Dentre as classes de fitormônios encontram-se as auxinas, citocininas, giberelinas, etileno e ácido abscísico (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Auxina é um grupo de compostos que contém um anel indol produzido pelas plantas, conhecido pela estimulação de respostas rápidas e pela regulação de processos fisiológicos e do desenvolvimento da planta (CLELAND, 1990), como no alongamento e na divisão celular. O ácido indolacético (AIA) é uma das substâncias mais importantes pertencentes ao grupo das auxinas, pois atua no crescimento das raízes e do caule através do alongamento das células nos meristemas, dependendo da concentração desse hormônio na planta (TAIZ; ZEIGER, 2004).

O AIA atua nas plantas de diversas maneiras como na divisão, alongamento e diferenciação celular, respostas gravitacionais, e na regulação das folhas (TEALE *et al.*, 2006). Dentre os microrganismos que são capazes de produzir AIA encontram-se algumas espécies de leveduras como *Saccharomyces uvarum* (SHIN *et al.*, 1991), *Cyberlindnera (Williopsis) saturnus* (NASSAR *et al.*, 2005), *Scheffersomyces (Pichia) spartinae* (RAO *et al.*, 2010), *Meyerozyma guilliermondii* (LIMTONG; KOOWADJANAKUL, 2012), apontando que essa característica é comum entre as diferentes espécies de leveduras. Apesar da biossíntese de AIA não ter sido totalmente esclarecida, o mecanismo de biossíntese de AIA em leveduras vem sendo estudado, e foram propostas duas principais vias (HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2021), a principal via que utiliza como precursor o triptofano e a via independente do triptofano para a biossíntese de AIA (SPAEPEN *et al.*, 2007).

O fósforo é um dos macronutrientes essenciais utilizados pelas plantas aplicados no solo através dos fertilizantes químicos (KHAN *et al.*, 2014), mas são imobilizados rapidamente em formas insolúveis adsorvidos a óxidos de ferro ou alumínio, e em formas precipitadas na solução do solo, onde podem ser complexadas a íons de alumínio, cálcio ou ferro (NOVAIS; SMITH, 1999). As plantas não conseguem absorver de forma eficiente, o que resulta em maiores aplicações desses fertilizantes no solo para suprir a necessidade da planta. No entanto, as aplicações em excesso podem levar a erosão do solo e o escoamento da água, ocasionando poluição ambiental e alto custo de produção (KHAN *et al.*, 2014).

Os microrganismos do solo estão envolvidos em vários ciclos de nutrientes, especialmente no ciclo do fósforo no solo, onde podem atuar na liberação de P tanto dos reservatórios inorgânicos como dos reservatórios orgânicos, por meio da solubilização e mineralização (MUNDRA *et al.*, 2011). A solubilização de fosfato ocorre principalmente através dos microrganismos que sintetizam e liberam ácidos carboxílicos, diminuindo o pH (XIAO *et al.*, 2013).

Entre os microrganismos que estão presentes no solo, as leveduras vêm se destacando por serem capazes de solubilizar os fosfatos inorgânicos (MUNDRA *et al.*, 2011; XIAO *et al.*, 2013; NUTARATAT *et al.*, 2014; FU *et al.*, 2016), e um dos principais mecanismos utilizados *in vitro* pelas leveduras é a produção de ácidos orgânicos (XIAO *et al.*, 2013), mas podem ser influenciados pelo pH, temperatura e presença de oxigênio (MUNDRA *et al.*, 2011; XIAO *et al.*, 2013). Em vista disso, mais estudos são necessários para avaliar as espécies de leveduras que são capazes de solubilizar fosfatos e os mecanismos que estão associados, assim como os fatores que podem afetar a capacidade de solubilização. Testes em solo devem ser realizados para o melhor entendimento dessa capacidade a fim de desenvolver produtos biotecnológicos que auxiliem a diminuição do impacto ambiental, menor custo, além de tornar a agricultura mais sustentável. Com isso, o objetivo desse trabalho foi avaliar as leveduras selecionadas quanto à produção de ácido indolacético e solubilização de fosfato tricálcico em diferentes meios de cultura.

3. Materiais e Métodos

3.1. Linhagens de leveduras avaliadas

As linhagens selecionadas para os testes de produção de AIA e solubilização de fosfato em meio líquido foram a MGA9 (*Torulaspota delbrueckii*), MP18 (*Torulaspota globosa*), MCP22 (*Torulaspota delbrueckii*), MA5 (*Aureobasidium melanogenum*), MGA12 (*Candida pseudointermedia*), MCP24 (*Trichosporon asahii*) e MGCP25 (*Cryptococcus laurentii*).

As leveduras foram mantidas em tubo de ensaio, em meio de cultura YPD inclinado cobertas com óleo mineral, e armazenadas em geladeira (4°C), até o início dos testes.

3.2 Produção de ácido indolacético (AIA) em meios líquidos

3.2.1 Preparo do inóculo

Para o preparo do inóculo de levedura, estas foram repicadas em placas de Petri com meio YPD sólido e incubadas a 30°C até o desenvolvimento das colônias. Após o crescimento, foi retirada uma alçada das colônias e transferida para Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de meio líquido YPD, mantidos sob agitação de 160 rpm, a 30°C por 48 horas. Após esse tempo, o conteúdo dos frascos foi centrifugado em tubos falcons a 3000 rpm por 5 minutos, em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em solução salina (NaCl 0,85%). Foi realizada a contagem de células e viabilidade celular (após coloração das células com solução de azul de metileno – citrato de sódio) em microscópio óptico em câmara de Neubauer.

3.2.2 Avaliação da produção de AIA

Para a avaliação da produção de AIA, foi realizado cultivo das linhagens de levedura em meio de cultura caldo batata (BD) contendo 20 g/L de glicose e meio de melaço clarificado a 20 g/L de ART, com a adição ou não de triptofano (0,01%) no meio, utilizando a metodologia modificada de diMenna (1957). As leveduras testadas foram selecionadas a partir de sua capacidade de crescer no meio de melaço (Capítulo 1).

As leveduras foram cultivadas em frascos Erlenmeyers de 125 mL com 50 mL de meio de caldo de batata ou melaço a 20 g/L de ART estéreis, com adição ou não de triptofano. Os frascos foram inoculados com 1 mL da suspensão de células de 1×10^7 células mL⁻¹, a fim de obter a concentração celular inicial de 2×10^5 células mL⁻¹. Os frascos foram mantidos em incubadora com agitação a 30°C, 160 rpm por 48 horas, com retirada de 2 mL de amostras para análise a cada 12 horas.

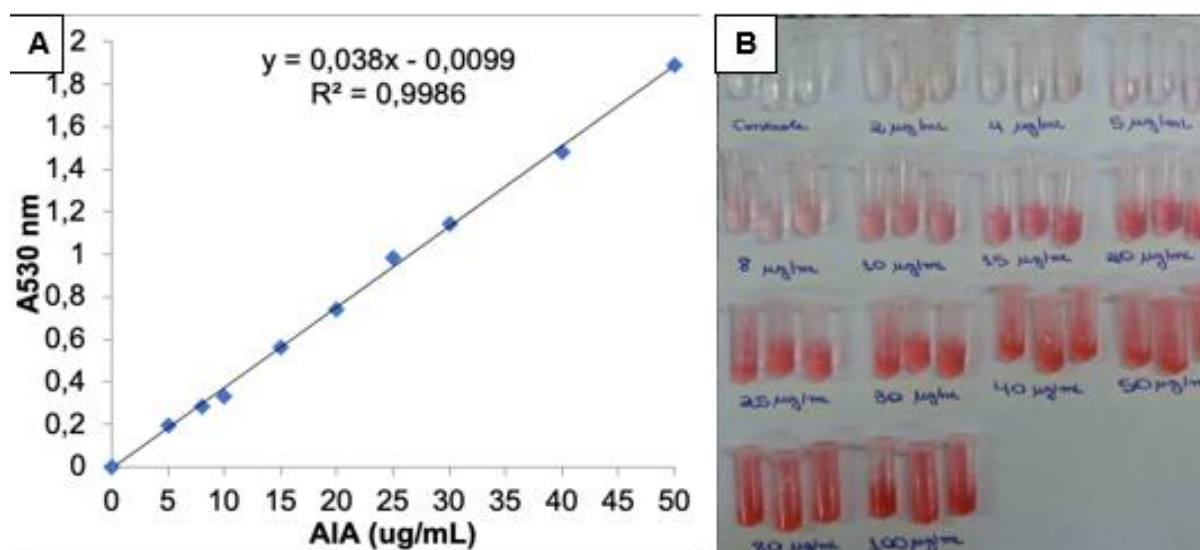
Foi realizada a avaliação da turbidez da amostra para determinar o crescimento celular em espectrofotômetro (600 nm). Em seguida a amostra foi centrifugada por 3 minutos a 3000 rpm, e 0,5 mL do sobrenadante foi transferido para microtubo com a adição de 0,5 mL do reagente Salkowski (GORDON; WEBER, 1951). Os microtubos foram gentilmente agitados para a mistura dos reagentes e incubados a temperatura ambiente, em local escuro, por 30 minutos. Após esse período, foi observado se houve desenvolvimento de coloração rosa, indicativo da presença de AIA no meio. A intensidade da cor foi determinada por análise em espectrofotômetro (530 nm). Para a quantificação da concentração de AIA no meio,

foi confeccionada uma curva padrão, com soluções de concentrações conhecidas de AIA como descrito abaixo. A partir dos dados obtidos de produção de AIA, foi realizado o cálculo de produtividade ($\mu\text{g/mL/h}$), através da relação de concentração produzida pelo tempo necessário para alcançar esse resultado. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com três repetições para cada tratamento, e a análise estatística foi feita utilizando o software Statistica v.7.

3.2.3 Curva de calibração para quantificação de AIA

Primeiramente foi preparada uma solução estoque na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ de ácido indolacético em balão volumétrico de 100 mL com água destilada. Em seguida, foram adicionados 10 mL da solução estoque em um balão volumétrico de 50 mL, completado e homogeneizado com água destilada (concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$), e a partir dessa solução foram preparadas 10 diluições com concentrações: 0, 5, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 40 e 50 $\mu\text{g/mL}$ de AIA. Os dados de absorvância foram analisados em gráfico de dispersão (X, Y) utilizando o software Microsoft Office Excel, obtendo-se a equação da reta e R^2 por meio de regressão linear (Figura 1).

Figura 1. A) Curva padrão com a equação para a quantificação da produção de AIA. B) Coloração rosa indica a presença de AIA no meio, após a reação com reagente de Salkowski; quanto mais intensa a cor, maior a concentração de AIA na solução.



Fonte: Elaborado pela própria autora (2022).

3.3 Solubilização de fosfato tricálcico em meios líquidos

3.3.1. Avaliação da solubilização de fosfato tricálcico

Para quantificação da solubilização de fosfato tricálcico pelas leveduras selecionadas foi realizado experimento em meio de cultura líquido NBRIP ou melaço diluído a 10 g/L de ART, complementados ou não com fosfato tricálcico (5 g de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ por litro) como fonte de fosfato insolúvel, e o pH foi ajustado com NaOH 12N. Para avaliação da solubilização relativa à atividade da levedura, foram utilizados frascos com e sem a inoculação das linhagens, segundo os tratamentos: T1: levedura + meio + fosfato, T2: meio + fosfato, e T3: meio + levedura.

Foram utilizados frascos Erlenmeyers de 125 mL, com 50 mL do meio testado. Os frascos inoculados com levedura receberam 1 mL de uma suspensão de 1×10^7 células mL^{-1} , a fim de obter a concentração celular inicial 2×10^5 células mL^{-1} . O inóculo utilizado foi preparado seguindo a mesma metodologia descrita no item 3.2.1. Os frascos foram incubados por 72 horas a 30°C, 160 rpm, com retirada de 2 mL de amostras para análise no tempo inicial e após 12, 24, 48 e 72 horas.

A determinação do crescimento celular foi realizada por meio da avaliação da densidade óptica em espectrofotômetro (600 nm).

A concentração de fosfato solúvel no meio de cultura foi realizada de acordo com a metodologia utilizada por Colzani *et al.* (2017) através do método colorimétrico do azul de molibdênio. Foram preparadas as soluções: A) 15 mL de ácido sulfúrico concentrado em um balão de 100 mL de água deionizada, B) 0,3 g de tartarato de antimônio e potássio em balão com 100 mL de água deionizada, C) 1,2 g de molibdato de amônio em balão com 100 mL de água deionizada e D) 1,76 g de ácido ascórbico em balão de 100 mL de água deionizada. A partir das soluções foi preparado um reagente misto, nas seguintes proporções e sequência: 5 mL da solução A + 1 mL da solução B + 5 mL da solução C + 5 mL da solução D.

A amostra a ser analisada foi centrifugada por 3 minutos a 3000 rpm, e 200 μL do sobrenadante foram transferidos para cada poço de uma microplaca de 96 poços. Em seguida, foram adicionados 50 μL do reagente misto em cada poço. As microplacas foram colocadas na leitora de microplacas Tecan Infinite[®]M200 com a leitura no comprimento de onda a 650 nm, após 15 minutos de reação. Para a quantificação da concentração de fósforo solúvel no meio, foi confeccionada a curva padrão com concentrações conhecidas de fósforo solúvel, como descrito no item 3.3.2.

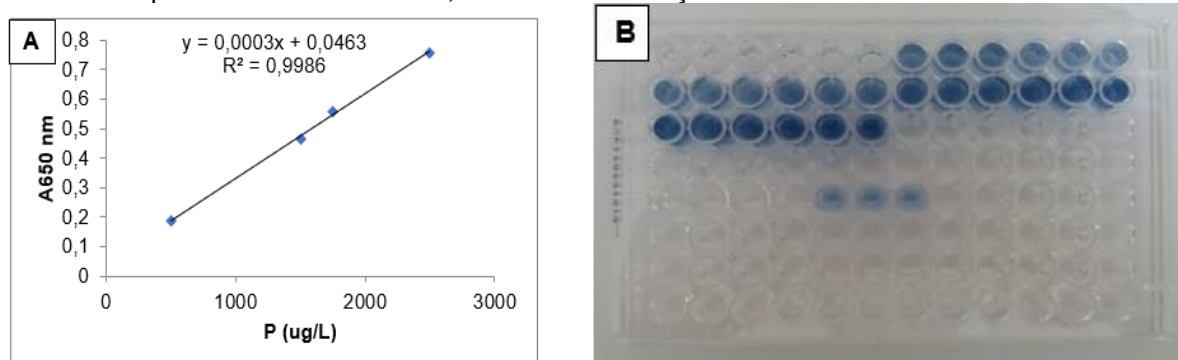
O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com três repetições para cada tratamento, e a análise estatística foi feita utilizando o software

Statistica v.7. Foi realizado o cálculo da concentração líquida de fósforo solúvel no meio de cultivo. Para tanto, os dados obtidos do tratamento com adição de fosfato insolúvel e sem adição de levedura foram subtraídos dos valores obtidos dos tratamentos com fosfato insolúvel com adição da levedura. Desta forma foi possível obter os valores de fósforo solubilizados devido à atividade da levedura no meio.

3.3.2. Construção da curva de calibração de fósforo

Para a preparação da curva padrão, foi preparada uma solução estoque de KH_2PO_4 na concentração de 50 mg/L de fósforo (P), ou seja, 220 mg de KH_2PO_4 diluído em 1 litro de água deionizada. Para o preparo das soluções foi feita uma solução de trabalho na concentração de 2,5 mg/L de P (5 mL da solução estoque de KH_2PO_4 em 100 mL de água deionizada). As soluções padrões foram preparadas nas concentrações de 500, 1500, 1750 e 2500 $\mu\text{g/L}$ de P. Para a realização da análise foram adicionados 200 μL de cada solução em três poços da microplaca, em seguida, foram adicionados 50 μL do reagente misto em cada poço. As microplacas foram colocadas na leitora de microplacas Tecan Infinite[®]M200 sendo realizadas as leituras de absorbância em 650 nm. Os dados de absorbância foram analisados em gráfico de dispersão (X, Y) utilizando o software Microsoft Office Excel, obtendo-se a equação da reta e R^2 por meio de regressão linear (Figura 2).

Figura 2. A) Curva padrão com a equação para a quantificação da solubilização de fosfato. B) Coloração azul indica a presença de fósforo solúvel no meio, após a reação com reagente misto; quanto mais intensa a cor, maior a concentração de fósforo solúvel no meio.



Fonte: Elaborado pela própria autora (2022).

4. Resultados e Discussão

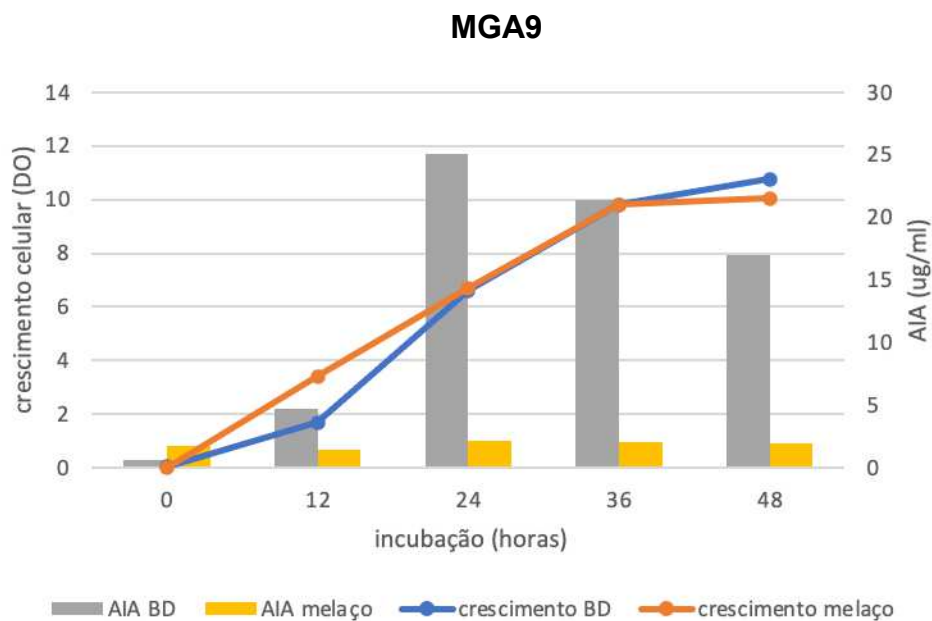
4.1. Quantificação da produção de ácido indolacético (AIA) em meios líquidos

As linhagens que se destacaram na produção de AIA foram MG9 e MCP22, ambas identificadas como da espécie *Torulaspora delbrueckii*. Na ausência de

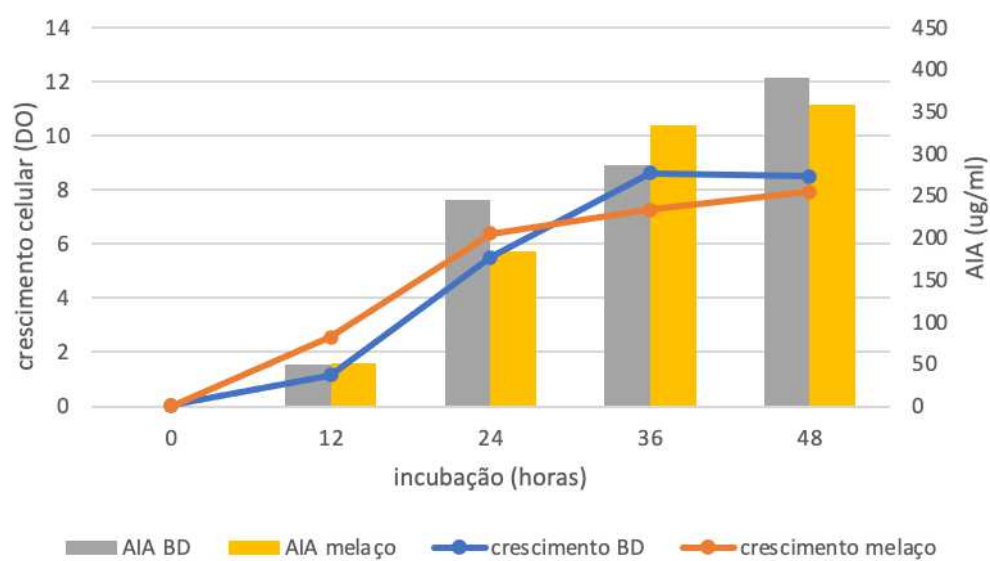
triptofano, as linhagens produziram AIA em meio BD; a linhagem MG9 alcançou 25 µg/mL de AIA após 24 horas de incubação, e a linhagem MCP22 produziu 18,4 µg/mL após 48 horas de incubação. Na presença de triptofano, porém, a quantidade de AIA produzida aumentou drasticamente, chegando a 390,3 µg/mL pela linhagem MGA9, e 371,8 µg/mL pela linhagem MCP22, ambas alcançando o pico de produção após 48 horas de incubação. No meio de melação, as linhagens não apresentaram produção significativa de AIA na ausência de triptofano; na presença do aminoácido, porém, a produção alcançou o pico de 357,8 µg/mL para a linhagem MG9, e 339 µg/mL para a linhagem MCP22, após 48 horas de incubação (Figuras 3 e 4).

Resultados similares podem ser observados no desempenho da linhagem MP18, identificada como sendo da espécie *Torulaspota globosa*. Na ausência de triptofano, no meio BD, a linhagem foi capaz de produzir 18,1 µg/mL de AIA, em 48 horas. Com triptofano, porém, a produção alcançou a concentração de 378,6 µg/mL de AIA no mesmo período de incubação. No meio de melação na ausência de triptofano, houve produção de apenas 3,8 µg/mL após 36 horas de incubação. Melação complementado com triptofano, por sua vez, proporcionou pico de produção em 48 horas de 350 µg/mL de AIA pela linhagem (Figura 5).

Figura 3. Produção de AIA e crescimento celular da linhagem MG9 (*T. delbrueckii*) em meio BD e melação, na presença e ausência de triptofano.



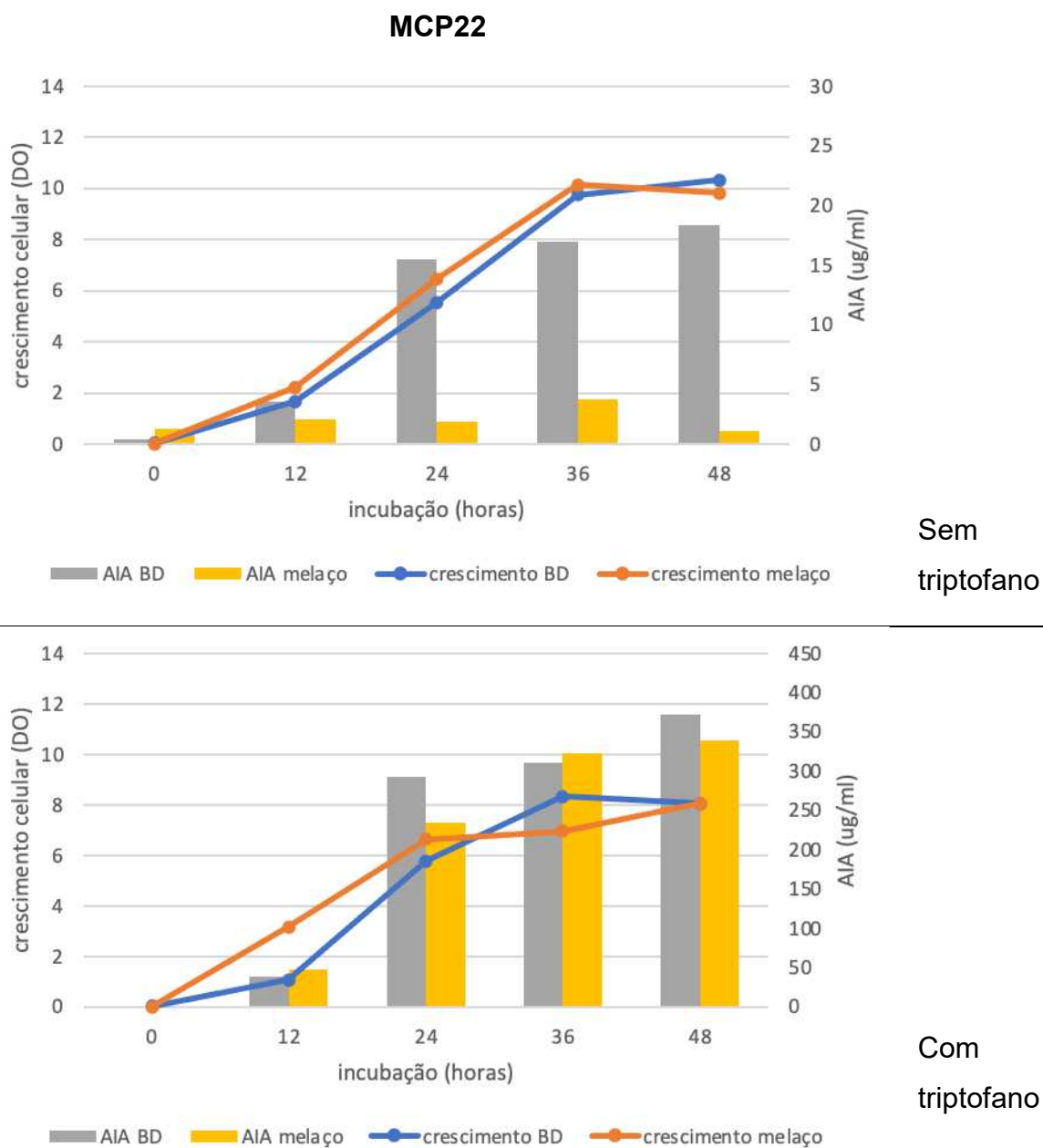
Sem
triptofano



Com
triptofano

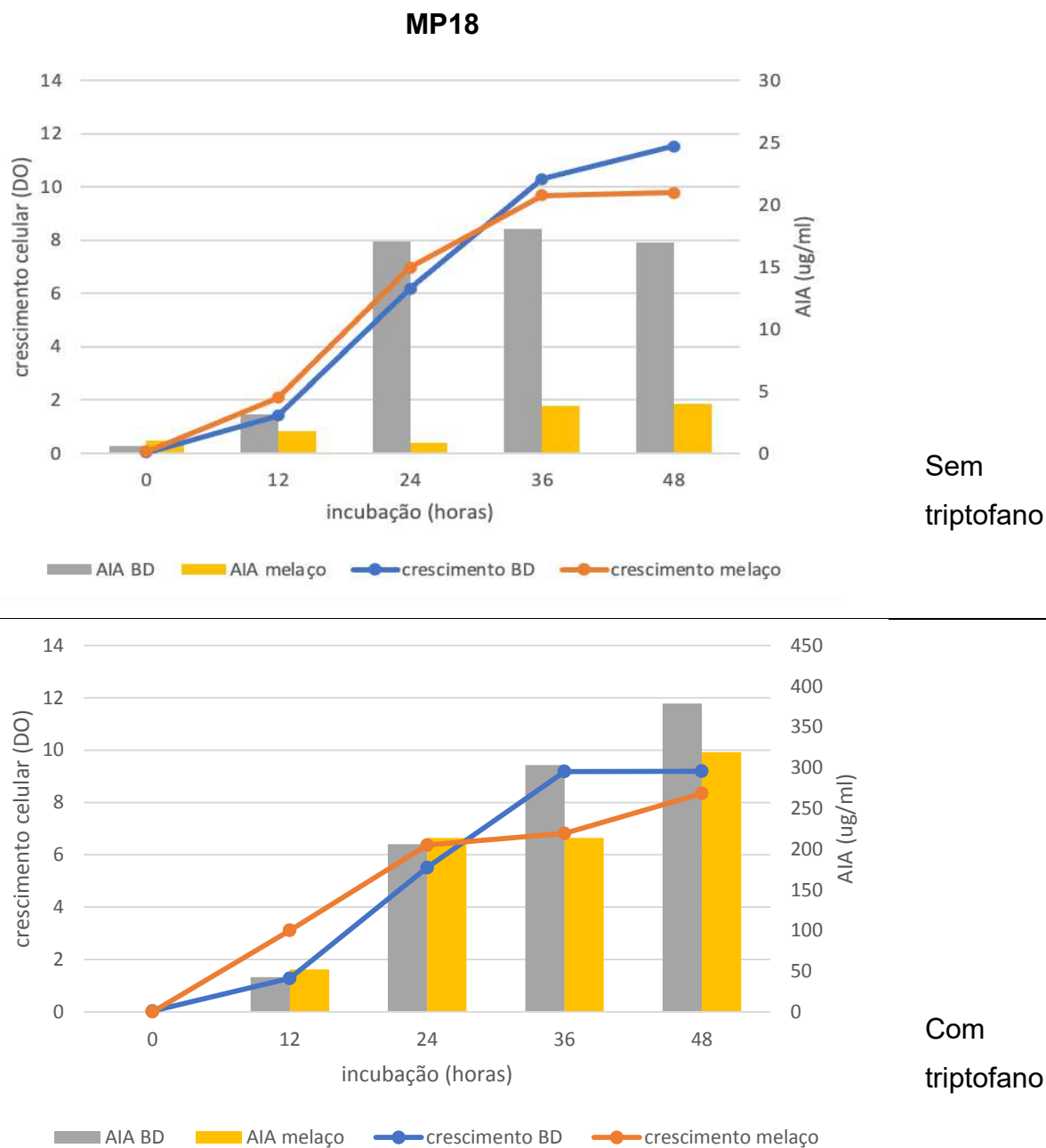
Fonte: Elaborado pela própria autora (2022).

Figura 4. Produção de AIA e crescimento celular da linhagem MCP22 (*T. delbrueckii*) em meio BD e melaço, na presença e ausência de triptofano.



Fonte: Elaborado pela própria autora (2022).

Figura 5. Produção de AIA e crescimento celular da linhagem MP18 (*T. globosa*) em meio BD e melação, na presença e ausência de triptofano.



Fonte: Elaborado pela própria autora (2022).

Para as três linhagens, a adição de triptofano no meio causou um prejuízo significativo no crescimento celular. A presença do AIA pode exercer tantos efeitos estimuladores como inibitórios sobre o crescimento da levedura (LIU *et al.*, 2016). Nos estudos de Sun *et al.* (2014), as concentrações baixas de AIA exógeno (sintético) não influenciaram e não promoveram o crescimento da levedura, mas quando foram adicionadas concentrações altas de AIA exógeno, o crescimento da

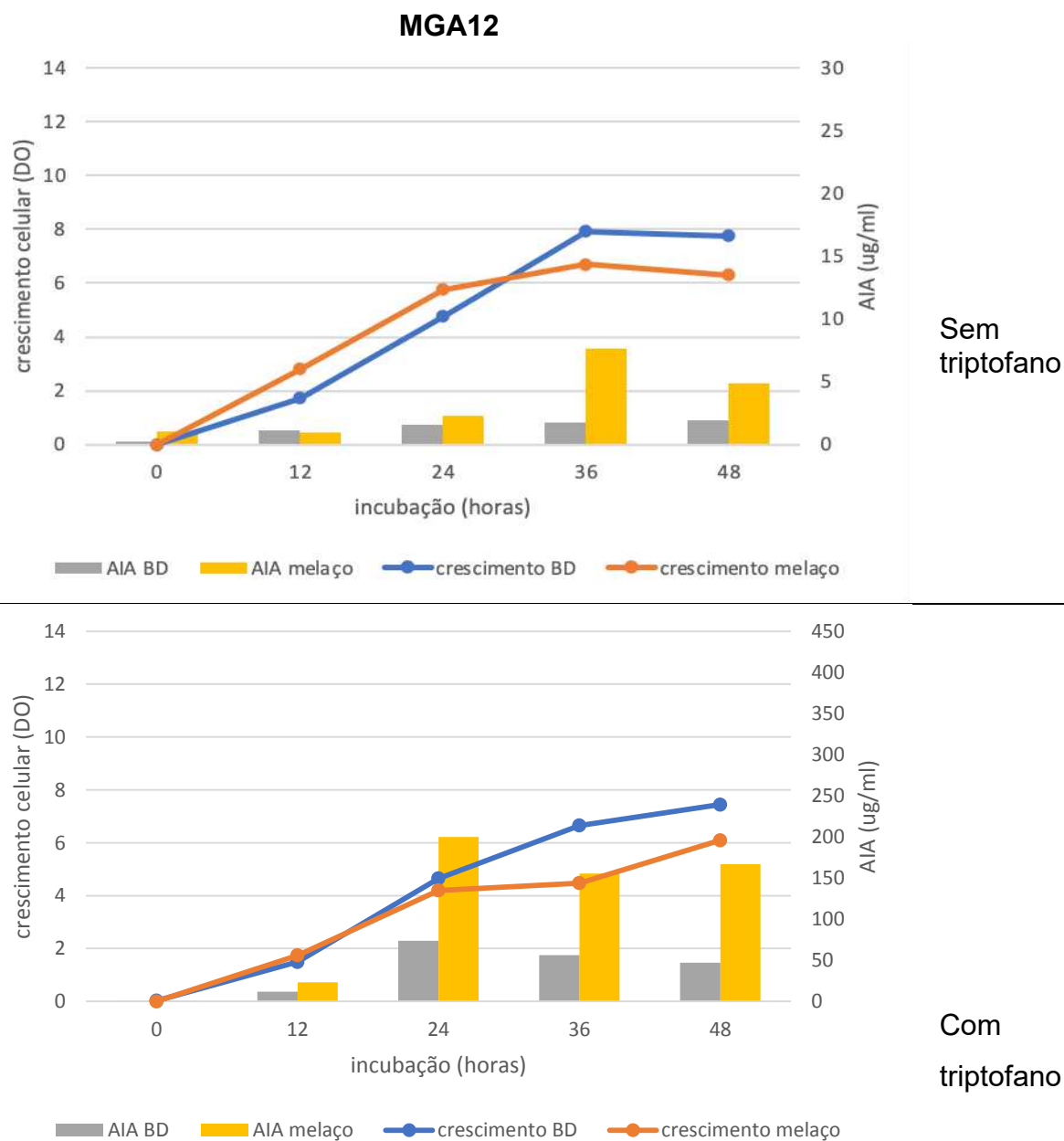
levedura foi reduzido drasticamente. Em processos biotecnológicos, a composição do meio é fundamental devido à concentração do produto e do custo de produção. A composição do meio inclui fontes de carbono, nitrogênio, fatores de crescimento e triptofano, ao mesmo tempo que o pH e a temperatura são fatores que também podem afetar a produção de AIA pelos microrganismos (SKOOG, 2010).

As plantas têm diversas vias para a biossíntese de AIA, dentre as principais, estão as vias dependentes e independentes de triptofano (MUJAHID *et al.*, 2011). A transformação do triptofano em AIA pode ocorrer por diversas rotas, dentre elas a rota do ácido indolpirúvico, que é a mais utilizada pelas plantas, rota da triptamina e a rota da indolacetaldoxima, utilizada pela família Brassicaceae (AZCÓN-BIETO, 2008). As rotas alternativas dependem da presença dos compostos endógenos sendo utilizados como intermediários, assim como sua capacidade em produzir respostas quando empregados nas plantas, na formação de AIA e na determinação das atividades enzimáticas que estão relacionadas às reações de cada rota (AZCÓN-BIETO, 2008).

Nos estudos de Nassar *et al.* (2005), os 24 isolados de leveduras apenas produziram AIA no meio em que foi adicionado triptofano. De acordo com Nakayan *et al.* (2013), apenas as leveduras *M. guilliermondii*, *Rh. mucilaginosa* e *M. caribbica*, apresentaram concentração baixa de AIA na ausência de triptofano. No estudo das rotas biossintéticas da produção de AIA pela espécie de levedura *Rhodospiridium paludigenum*, Nutaratat *et al.* (2016) verificaram a produção de AIA na presença de triptofano, utilizando como rota alternativa (intermediária) o ácido indolpirúvico. Essa rota alternativa também foi evidenciada nos estudos de Rao *et al.* (2010) pelas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*.

A linhagem MGA12 identificada como sendo da espécie *Candida pseudointermedia*, também apresentou alta produção de AIA se comparada às outras linhagens avaliadas. Na ausência de triptofano, porém, a produção de AIA é baixa, com máximo observado no meio de melão após 36 horas de incubação (7,7 µg/mL). O meio de melão para esta linhagem proporcionou melhor condição para a produção de AIA (199,9 µg/mL em 24 horas de incubação), enquanto para o meio BD a linhagem não mostrou o mesmo desempenho, com máximo de 73,8 µg/mL também após 24 horas de incubação, ambos na presença de triptofano (Figura 6).

Figura 6. Produção de AIA e crescimento celular da linhagem MGA12 (*Candida pseudointermedia*) em meio BD e melaço, na presença e ausência de triptofano.



Fonte: Elaborado pela própria autora (2022).

Sabe-se que os microrganismos possuem capacidade de produzir AIA e também podem degradá-lo (SCOTT *et al.*, 2013) como uma forma de sobrevivência devido à acidificação do citoplasma, que ocorre através do aumento excessivo das concentrações de AIA que se tornam tóxicas às células e aos vegetais (TROMAS; PERROT-RECHENMANN, 2010).

As demais linhagens, MA5 (*Aureobasidium melanogenum*), MCP24 (*Trichosporon asahii*) e MGCP25 (*Cryptococcus laurentii*) apresentaram produção de

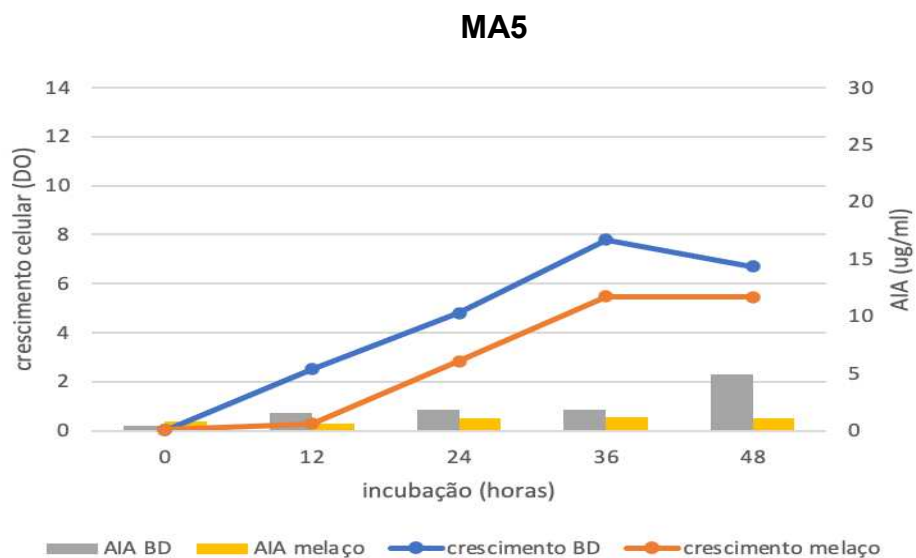
AIA significativamente inferior às linhagens anteriormente descritas, nas condições avaliadas. Apesar disso, as produções observadas não são desprezíveis, considerando que altas concentrações de AIA podem ser prejudiciais ao desenvolvimento vegetal, por exercer efeito inibitório nos processos fisiológicos da planta e levando à inibição da germinação de sementes (SINDHU; SEHRAWAT, 2017) e ao crescimento da planta, devido à alta produção de etileno e de ácido abscísico (ABA), causando anormalidades no crescimento do vegetal e senescência (GROSSMANN, 2010).

A linhagem MA5 apresentou produção muito baixa de AIA na ausência de triptofano, sendo que o máximo alcançado não ultrapassou 5 µg/mL em meio BD, após 48 horas de incubação. Na presença de triptofano, porém, no mesmo meio e tempo de incubação, a linhagem alcançou 110,1 µg/mL de AIA. Em melaço com triptofano, no mesmo período, a linhagem produziu 77,2 µg/mL (Figura 7).

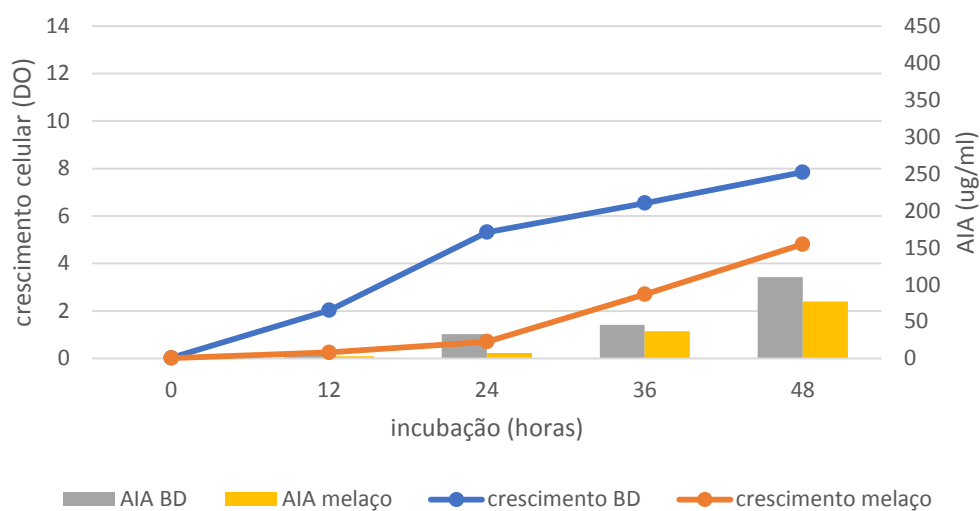
Para as linhagens MCP24 e MGCP25 o meio de melaço na presença de triptofano superou a produção do meio BD, também com adição do aminoácido (Figura 8 e 9).

Quanto à produtividade de AIA (µg/mL/h), dentre as linhagens de leveduras avaliadas a MCP22 (*T. delbrueckii*) foi a que se destacou, com produtividade superior a todas as outras linhagens avaliadas, apenas não diferindo de MGA9 (também identificada como *T. delbrueckii*). Nos dois casos, o pico de produção foi obtido em 24 horas de cultivo no meio de cultura BD. Os melhores resultados de produtividade obtidos em melaço também são com essas duas linhagens de *T. delbrueckii*, com pico de produção após 24 horas para MCP22 e 48 horas para MGA9 (Figura 10).

Figura 7. Produção de AIA e crescimento celular da linhagem MA5 (*Aureobasidium melanogenum*) em meio BD e melaço, na presença e ausência de triptofano.



Sem
triptofano



Com
triptofano

Fonte: Elaborado pela própria autora (2022).

Figura 8. Produção de AIA e crescimento celular da linhagem MCP24 (*Trichosporon asahii*) em meio BD e melação, na presença e ausência de triptofano.

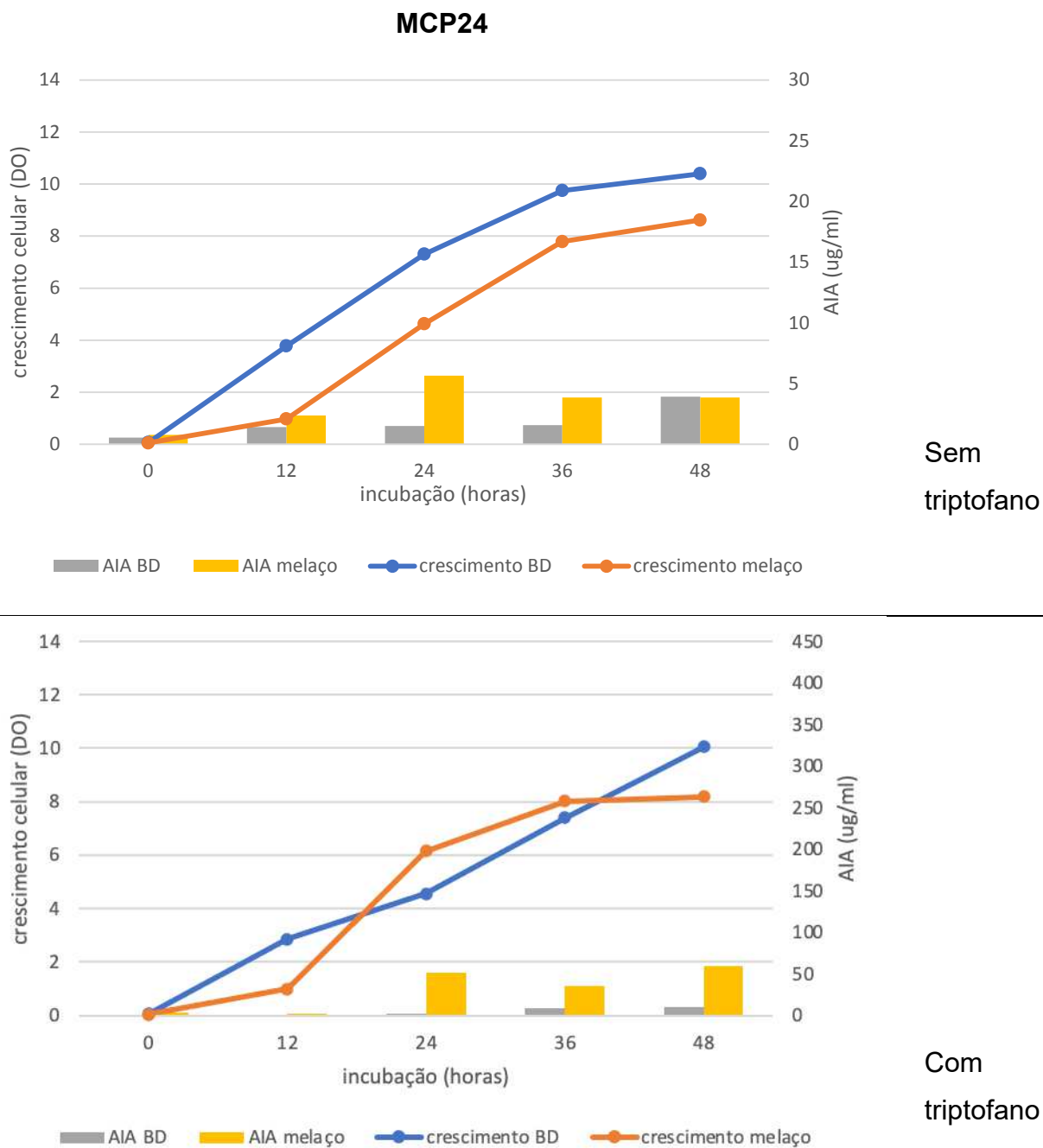
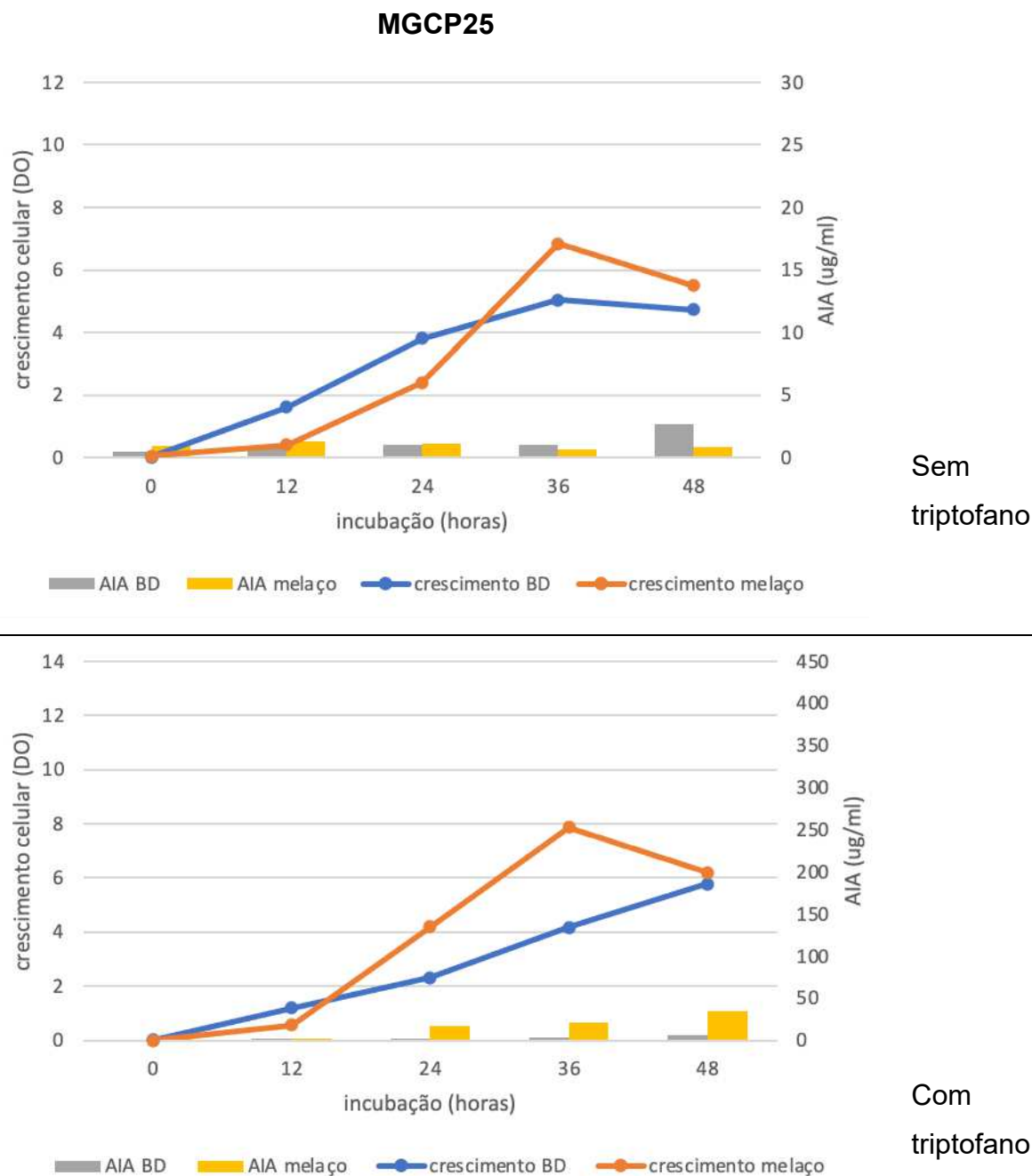
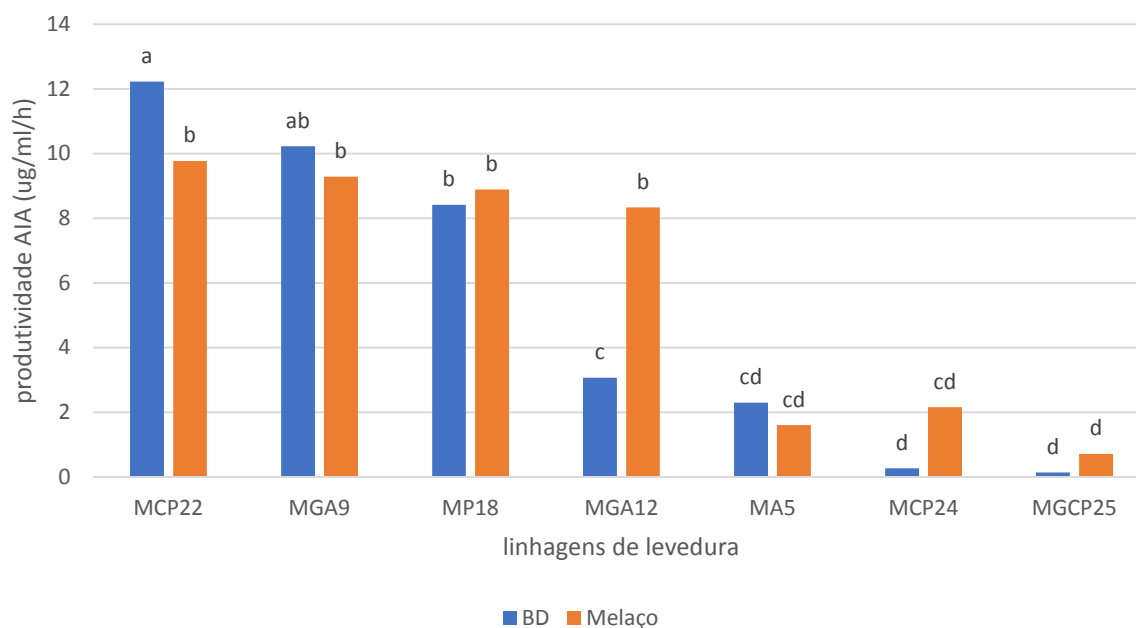


Figura 9. Produção de AIA e crescimento celular da linhagem MGCP25 (*Cryptococcus laurentii*) em meio BD e melaço, na presença e ausência de triptofano.



Fonte: Elaborado pela própria autora (2022).

Figura 10. Produtividade de AIA observada nas linhagens de levedura testadas. *Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.



Fonte: Elaborado pela própria autora (2022).

A adição de triptofano causou prejuízo significativo ao crescimento celular em ambos os meios de cultura para todas as linhagens avaliadas, exceto para a linhagem MGCP25, na qual a adição não resultou em alterações no crescimento celular. A presença do aminoácido, porém, promoveu aumento significativo na produção de AIA em todas as condições testadas, para os dois meios de cultura e para todas as linhagens (Tabela 1). O aumento da concentração de AIA no meio pode causar prejuízo para o crescimento celular devido a diminuição do valor de pH, causada pela produção de ácidos orgânicos e/ou liberação de íons H^+ ; visto que o acúmulo de AIA é diretamente proporcional à queda do pH (SUN *et al.*, 2014).

Tabela 1. Relação do efeito dos tratamentos sobre o crescimento e produtividade de AIA pelas linhagens de leveduras avaliadas

| linhagem | Crescimento celular (DO) | | Produtividade de AIA ($\mu\text{g/mL/h}$) | | | | | |
|---------------|--------------------------|------------|---|------------|---------------------|-------------------|--------------------|------|
| | meio ¹ | triptofano | meio ¹ | triptofano | BD** | Tmax ² | Melaço** | Tmax |
| MGA9 | sds* | sem | BD | com | 10,22 ^{ab} | 24 h | 9,28 ^b | 48 h |
| MGA12 | BD | sem | Melaço | com | 3,07 ^c | 24 h | 8,33 ^b | 24 h |
| MP18 | sds | sem | sds* | com | 8,41 ^b | 36 h | 8,89 ^b | 24 h |
| MCP22 | melaço | sem | BD | com | 12,22 ^a | 24 h | 9,77 ^b | 24 h |
| MA5 | BD | sem | BD | com | 2,29 ^{cd} | 48 h | 1,6 ^{cd} | 48 h |
| MCP24 | BD | sem | Melaço | com | 0,26 ^d | 36 h | 2,15 ^{cd} | 24 h |
| MGCP25 | melaço | sds* | Melaço | com | 0,137 ^d | 48 h | 0,71 ^d | 24 h |

¹meio de cultura que apresentou resultado significativamente superior para a variável analisada

*sds – sem diferença significativa entre os meios de cultura testados

²tempo (horas) em a linhagem de levedura alcançou maior produtividade de AIA

**Letras diferentes indicam diferença significativa entre as linhagens (na coluna), ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

O triptofano é precursor da produção de AIA para a maioria dos microrganismos, mas nem todos os microrganismos conseguem biossintetizar o triptofano, que pode não estar disponível ou na concentração adequada para sintetizar o AIA (LIU *et al.*, 2016). Esse aminoácido possui estrutura complexa de anel duplo, o que gera maior custo energético para o microrganismo devido à alta demanda de energia para a sua síntese (BARLON *et al.*, 2010).

Poucos estudos investigaram a via biossintética de AIA em leveduras (RAO *et al.*, 2010; NUTARATAT *et al.*, 2016), sendo que a principal via reportada para a biossíntese de AIA é a via do ácido indol-3-pirúvico, baseada nos estudos com as leveduras *S. cerevisiae* (RAO *et al.*, 2010) e *R. fluvialis* (BUNSANGIAM *et al.*, 2019). Para isso, o triptofano é convertido em ácido pirúvico através da atividade da aminotransferase, em seguida é carboxilado a indol-3-acetaldeído (AIAld) por meio da atividade da indol-3-piruvato descarboxilase e por fim, o AIAld é oxidado em AIA (HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2021). Além disso, o ácido indol-3-pirúvico também pode ser convertido em AIA pela atividade do indol-3-piruvato monooxigenase de forma direta (BUNSANGIAM *et al.*, 2019). A via de biossíntese para a produção de AIA depende de vários fatores tais como a cepa utilizada, composição do meio e a concentração do precursor AIA (HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2021).

Limtong e Koowadjanakul (2012), ao cultivarem em meio de cultura YPD suplementado com triptofano o isolado de *M. guilliermondii* (LM120) após 7 dias de cultivo, verificaram a produção de 68,1 $\mu\text{g/mL}$ de AIA. Resultados semelhantes

foram encontrados com o isolado de *T. globosa* (linhagem 5S55) que também apresentou alta produção de AIA, 377,9 µg/mL (OLIVEIRA, 2016). A partir disso fica evidenciado que a capacidade da maioria dos isolados de levedura do solo para a produção de AIA suplementado com triptofano é significativamente maior do que a maioria das cepas encontradas na literatura (NASSAR *et al.*, 2005; XIN *et al.*, 2009; LIMTONG; KOOWADJANAKUL, 2012; NUTARATAT, 2014).

Os estudos de Nutaratat *et al.* (2016) em que foram analisadas as rotas biossintéticas de produção de AIA, mostraram que a levedura isolada *Rhodosporidium paludigenum* (DMKU-RP301) utiliza uma via dependente de triptofano, sendo a rota intermediária o ácido indolpirúvico. Assim como no trabalho de Rao *et al.* (2010), também foi encontrada uma via dependente de triptofano, sendo a rota intermediária o ácido indolpirúvico em linhagens de leveduras *S. cerevisiae*. Nassar *et al.* (2005) avaliaram a produção de AIA em 24 isolados de leveduras, os quais apresentaram resultados de produção de AIA apenas quando o triptofano foi adicionado no meio de cultivo.

A técnica colorimétrica com reagente de Salkowski é considerada o teste inicial para a avaliação da produção de compostos indólicos, muito utilizado para selecionar as linhagens microbianas por ser considerado um método rápido e barato. Para confirmar a produção de AIA é necessário que seja realizada a análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC) ou pela cromatografia gasosa acoplada a espectrofotometria de massa (CG-EM) (LIU *et al.*, 2016).

No trabalho de Oliveira (2016), dois isolados de *T. asahii* (3S44 e 4C06) não apresentaram produção líquida de AIA em meio de cultura de caldo de batata, suplementado ou não com triptofano, e duas linhagens de *T. globosa* (5S51 e 5S55) apresentaram produção líquida média de AIA apenas na presença de triptofano, sendo de 219,7 e 377,9 µg/mL, respectivamente. No estudo de Nutaratat *et al.* (2014), a linhagem de *T. globosa* apresentou produção de 4,9 µg/mL no cultivo em meio YPD complementado com triptofano.

A levedura *T. asahii* isolada da rizosfera de beterraba em cultivo em meio YPD complementado com triptofano produziu 31,7 µg/mL (EL-TARABILY, 2004). De acordo com os estudos de Deng *et al.* (2012), a levedura *Cryptococcus sp.* (CBSB78), isolada de *Brassica chinensis*, apresentou produção de AIA (11,7 µg/mL) e promoveu o crescimento da espécie vegetal *Brassica spp.*, além de aumentar a resistência da planta a metais pesados. A levedura *Aureobasidium pullulans* (YL-11)

isolada de *Drosera indica* (planta carnívora) produziu 147,4 µg/mL de AIA em meio de cultura YPD complementado com triptofano a 28°C (SUN *et al.*, 2014).

A terceira linhagem com melhor resultado de produtividade foi a MP18 (*T. globosa*). A linhagem apresentou produtividade semelhante nos meios de BD e melaço, de 8,4 e 8,3 µg/mL/h, respectivamente. O meio de melaço, porém, possibilitou que a linhagem alcançasse o máximo de produtividade em 24 horas de incubação, sendo que no meio BD isso somente ocorreu em 48 horas. O uso de subprodutos da agroindústria para a produção de moléculas de alto valor agregado como o AIA é interessante, pois possibilita a produção com baixo custo, além do emprego do resíduo, que se não tem uso definido, pode ser descartado no ambiente, causando desequilíbrio e prejuízo ambiental.

4.2 Solubilização de fosfato tricálcico em meio de cultura líquido

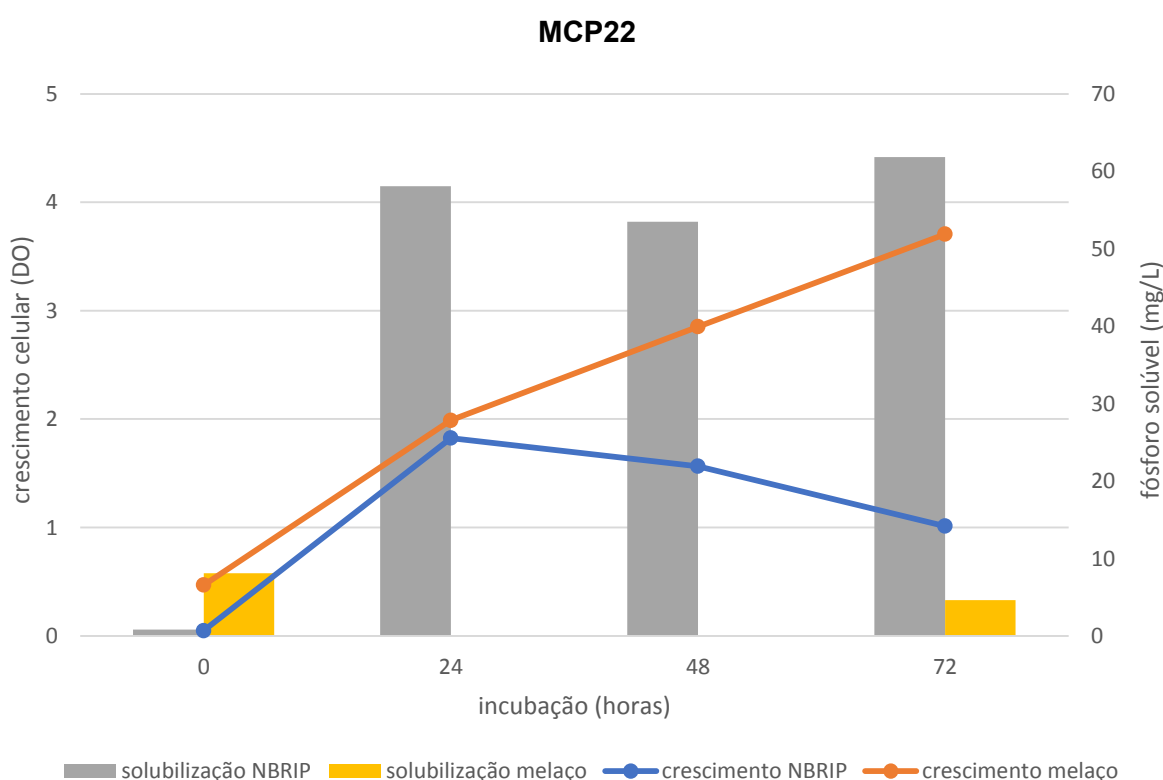
Os resultados obtidos nos ensaios de solubilização mostraram que para todas as linhagens avaliadas, o meio de cultura NBRIP ofereceu as melhores condições para a solubilização do fosfato tricálcico. Apesar disso, o meio não proporcionou um bom crescimento celular. A curva de crescimento para a maioria das linhagens avaliadas alcança a fase estacionária em 48 horas de incubação, com valores de densidade óptica (DO) próximo a 1. Esse dado, comparado ao do meio de melaço, indica que para a manutenção do fósforo solúvel no meio, o crescimento celular não é bom, pois as células acabam por promover a imobilização do nutriente. O meio de melaço, mais rico nutricionalmente, promoveu maior crescimento celular, sendo que as curvas de crescimento celular indicam que ainda não alcançaram a fase estacionária mesmo após 72 horas de incubação, com DO chegando próximo ou superando 4. Esse crescimento se refletiu em concentrações de P solúvel distintos nos diferentes tempos de análise, muitas vezes com os valores chegando a zero, provavelmente devido ao consumo do nutriente pela levedura. Os dados de solubilização líquida de fósforo (Figuras 11 a 17) mostram a variação de liberação do fósforo insolúvel (fosfato tricálcico) adicionado ao meio, a partir da relação dos dados obtidos entre os tratamentos com e sem a inoculação da levedura.

Para a solubilização microbiana de fosfato, o emprego de um meio de cultura nutricionalmente limitado mas que estimula a produção de ácidos orgânicos que atuam na liberação do fósforo é importante. Além da seleção de linhagens solubilizadoras, os ensaios também podem direcionar à métodos de

biossolubilização *in vitro*, os quais podem ser utilizados como forma alternativa de obtenção dos minerais para a produção de fertilizantes solúveis.

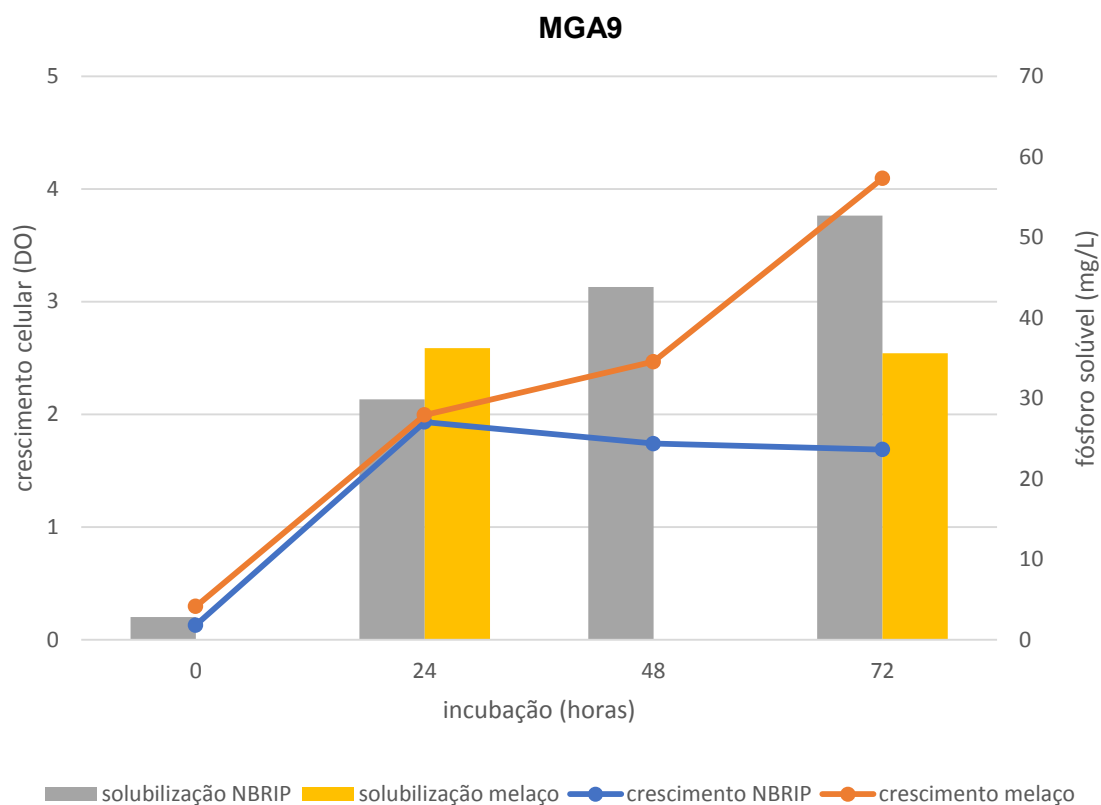
A maioria dos solos brasileiros apresenta pouco fósforo assimilável pelas plantas, em muitos casos devido à maior quantidade de óxidos de alumínio e ferro presentes nos solos (NOVAIS; SMITH, 1999). Com isso, é necessária a utilização dos fertilizantes fosfatados para suprir as necessidades das plantas, gerando dependência do Brasil ao mercado externo, uma vez que no Brasil sua produção se torna inviável devido à escassez da matéria-prima e ao alto custo de produção (HINSINGER, 2001). As fontes de fosfato utilizadas na produção dos fertilizantes têm se esgotado no mundo todo (BOUWMAN *et al.*, 2009), tornando importante e essencial a busca por tecnologias capazes de promover a maior eficiência do fósforo no solo.

Figura 11. Solubilização de fosfato tricálcico e crescimento celular da linhagem MCP22 (*T. delbrueckii*) em meio NBRIP e melação.



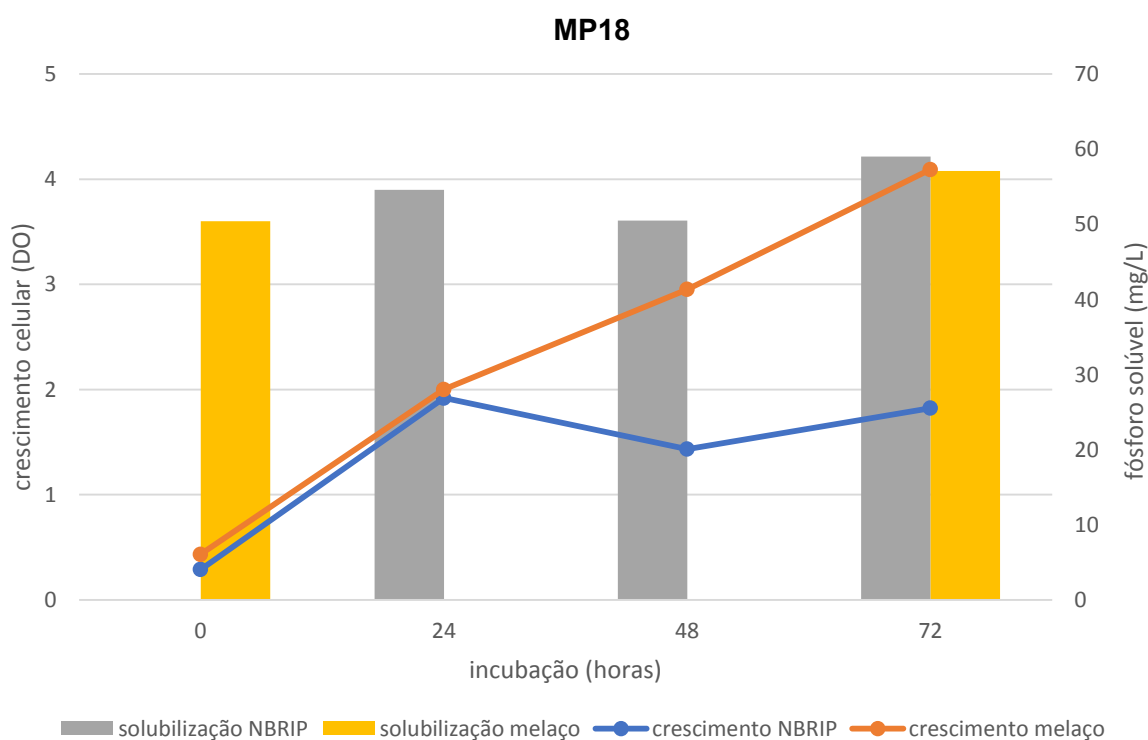
Fonte: Elaborado pela própria autora (2022).

Figura 12. Solubilização de fosfato tricálcico e crescimento celular da linhagem MGA9 em meio NBRIP e melão.



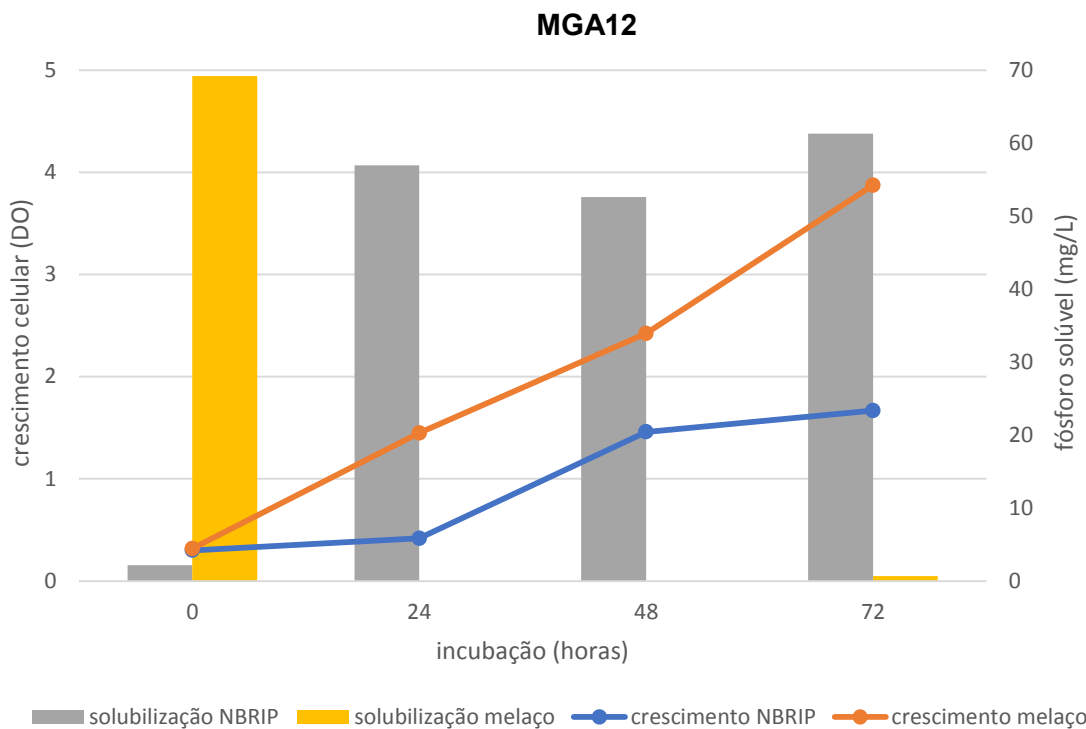
Fonte: Elaborado pela própria autora (2022).

Figura 13. Solubilização de fosfato tricálcico e crescimento celular da linhagem MP18 (*T. globosa*) em meio NBRIP e melão.



Fonte: Elaborado pela própria autora (2022).

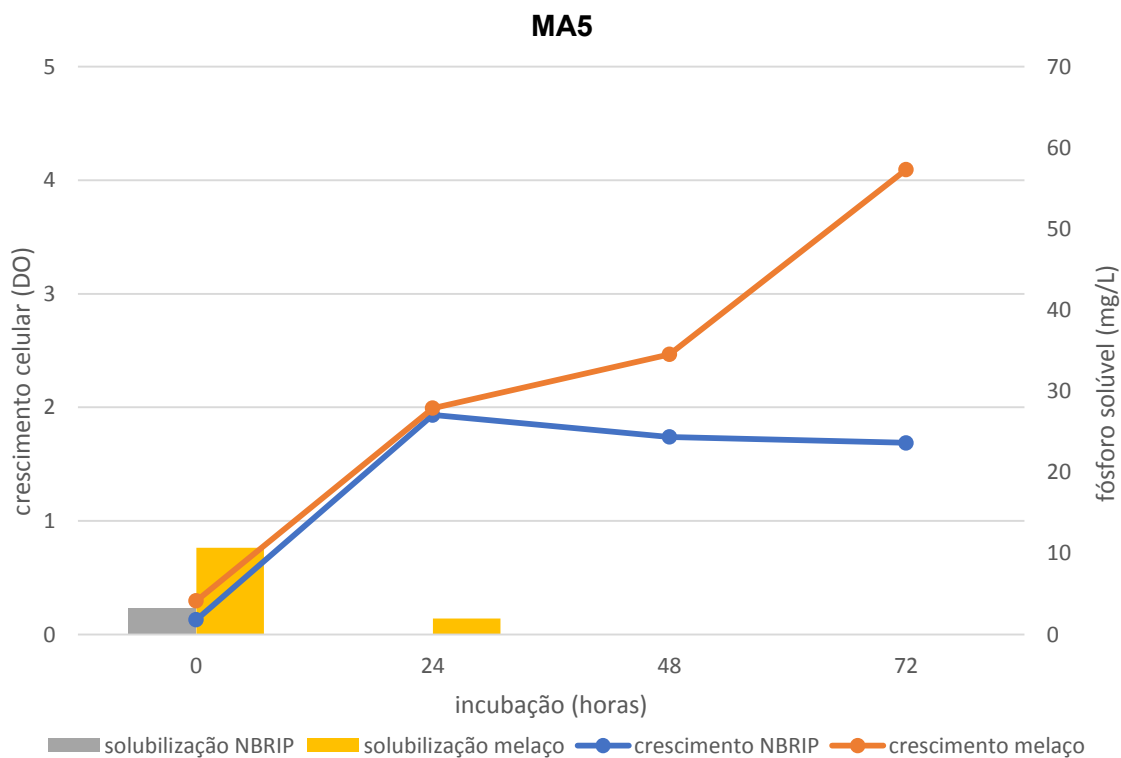
Figura 14. Solubilização de fosfato tricálcico e crescimento celular da linhagem MGA12 (*C. pseudointermedia*) em meio NBRIP e melão.



Elaborado pela própria autora (2022).

Fonte:

Figura 15. Solubilização de fosfato tricálcico e crescimento celular da linhagem MA5 (*A. melanogenum*) em meio NBRIP e melão.



Fonte: Elaborado pela própria autora (2022).

Figura 16. Solubilização de fosfato tricálcico e crescimento celular da linhagem MCP24 (*T. asahii*) em meio NBRIP e melão.

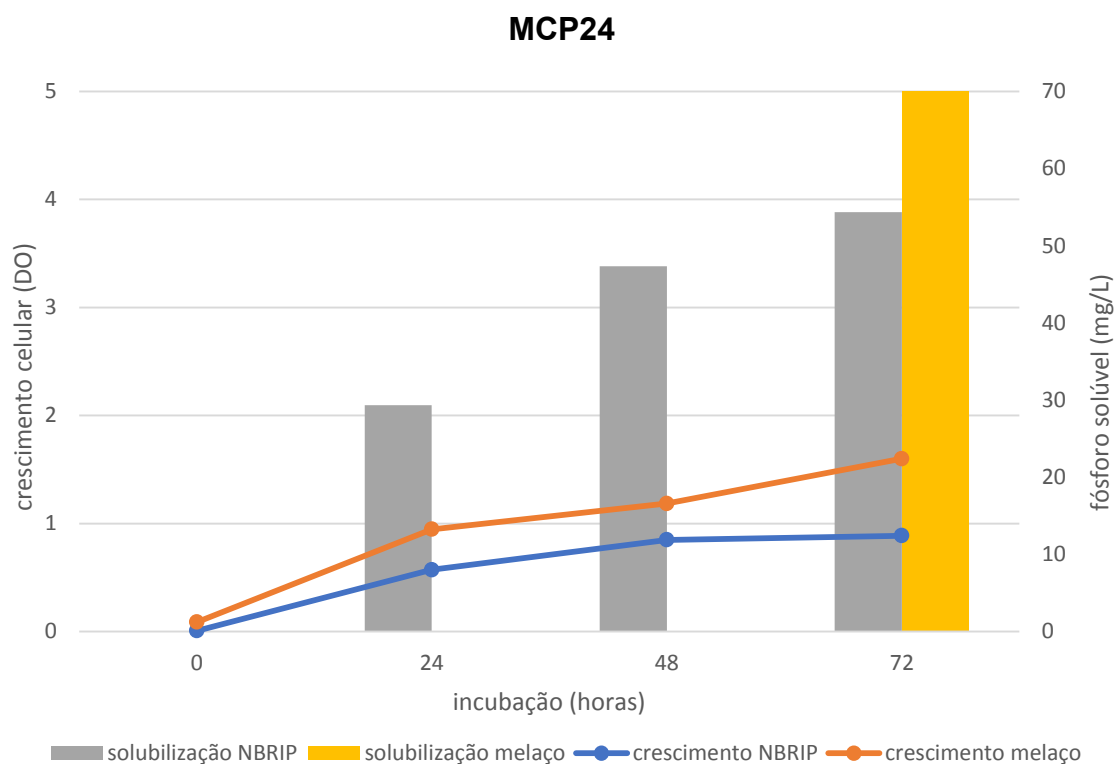
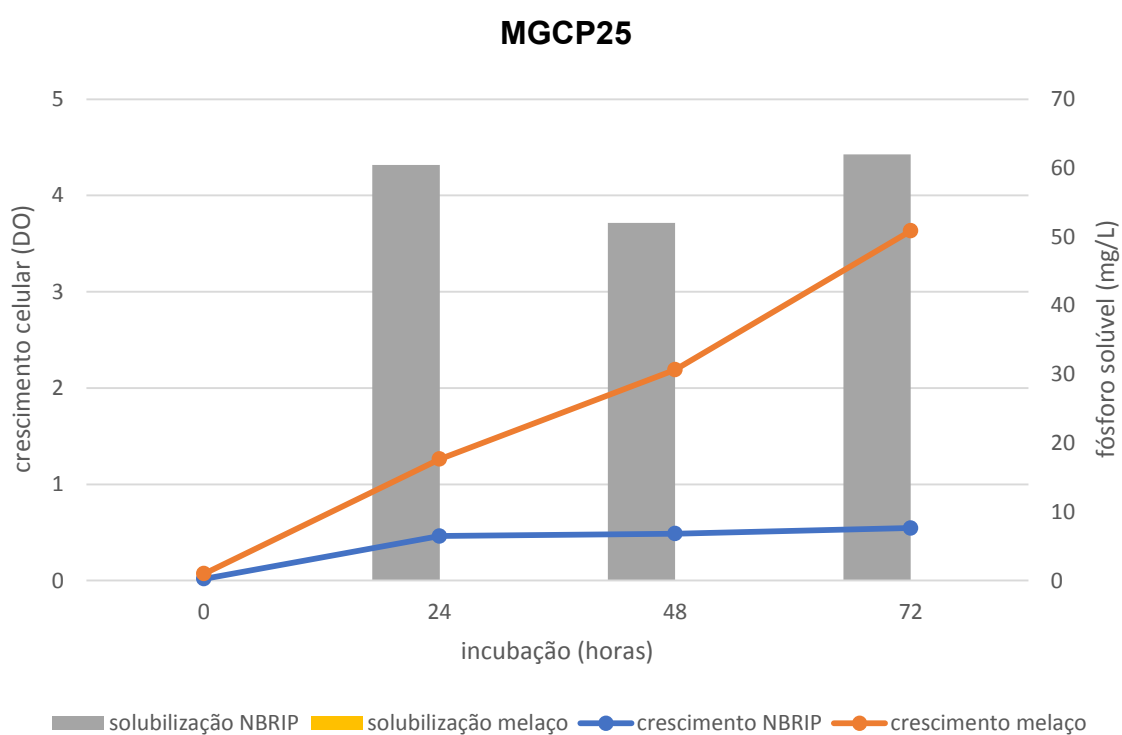


Figura 17. Solubilização de fosfato tricálcico e crescimento celular da linhagem MGCP25 (*C. laurentii*) em meio NBRIP e melão.



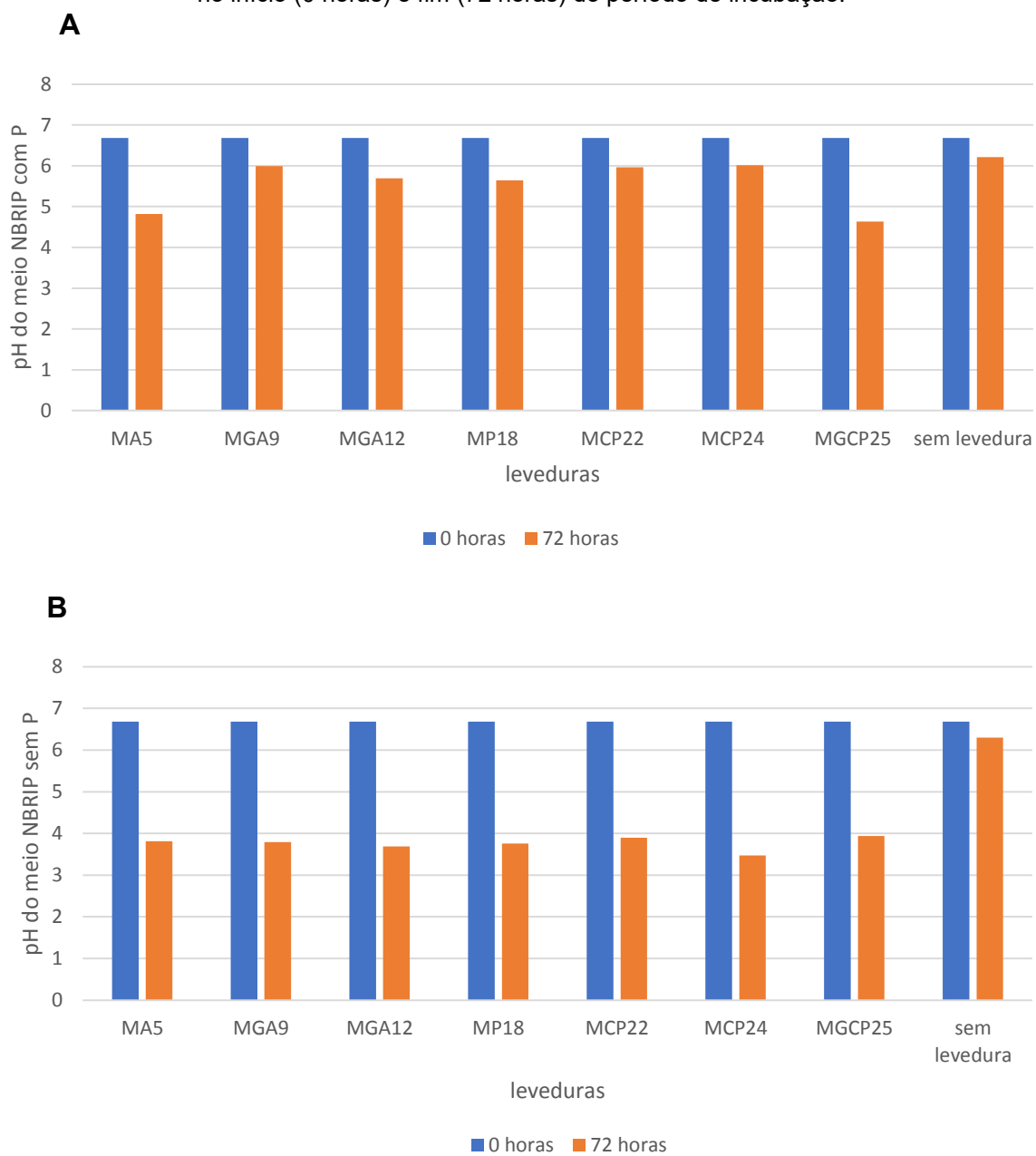
Todas as leveduras foram capazes de promover a queda do pH do meio de cultura NBRIP (Figura 18B), o que pode ser facilmente observado quando o meio de cultura não recebe a adição de fosfato tricálcico. Os ácidos orgânicos produzidos por cada uma das linhagens podem variar, o que pode afetar a sua capacidade em solubilizar o fosfato nas condições impostas. Para os tratamentos que receberam o fosfato insolúvel, porém, o tamponamento do meio é observado (Figura 18A), como reflexo da solubilização, que resulta na liberação de íons básicos de fosfato e cálcio no meio. Para a levedura MA5, por exemplo, a solubilização foi pequena e a liberação de fósforo solúvel no meio foi quase nula. Por isso é possível observar que mesmo no meio NBRIP com fosfato insolúvel, o pH após 72 horas permaneceu menor que 5. Esse dado muda para outras leveduras com dados expressivos de solubilização, como a MCP22, na qual o pH se mantém em 6,0. Exceção é observada para a levedura MGCP 25, que obteve bons resultados de solubilização, porém com a manutenção do pH do meio menor que 5.

Para o meio de melado, a avaliação da variação do pH é mais difícil devido à complexidade química do meio. Apesar disso, pode também ser observada uma queda mais acentuada do pH para algumas leveduras (MGA9, MGA12, MP18 e MCP22), quando o fosfato não é adicionado (Figura 19B). Para as outras linhagens de levedura, porém, a variação não é observada após 72 horas de incubação em nenhuma condição avaliada (Figura 19A e B).

Mundra *et al.* (2011), ao estudarem os efeitos da temperatura, crescimento e pH na solubilização de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ pela *Rhodotorulasp.* (PS4), identificaram que a maior atividade de crescimento e solubilização ocorreu entre 28-30°C e as concentrações de fosfato solúvel foram de 261,3 e 278,3 mg/L, respectivamente.

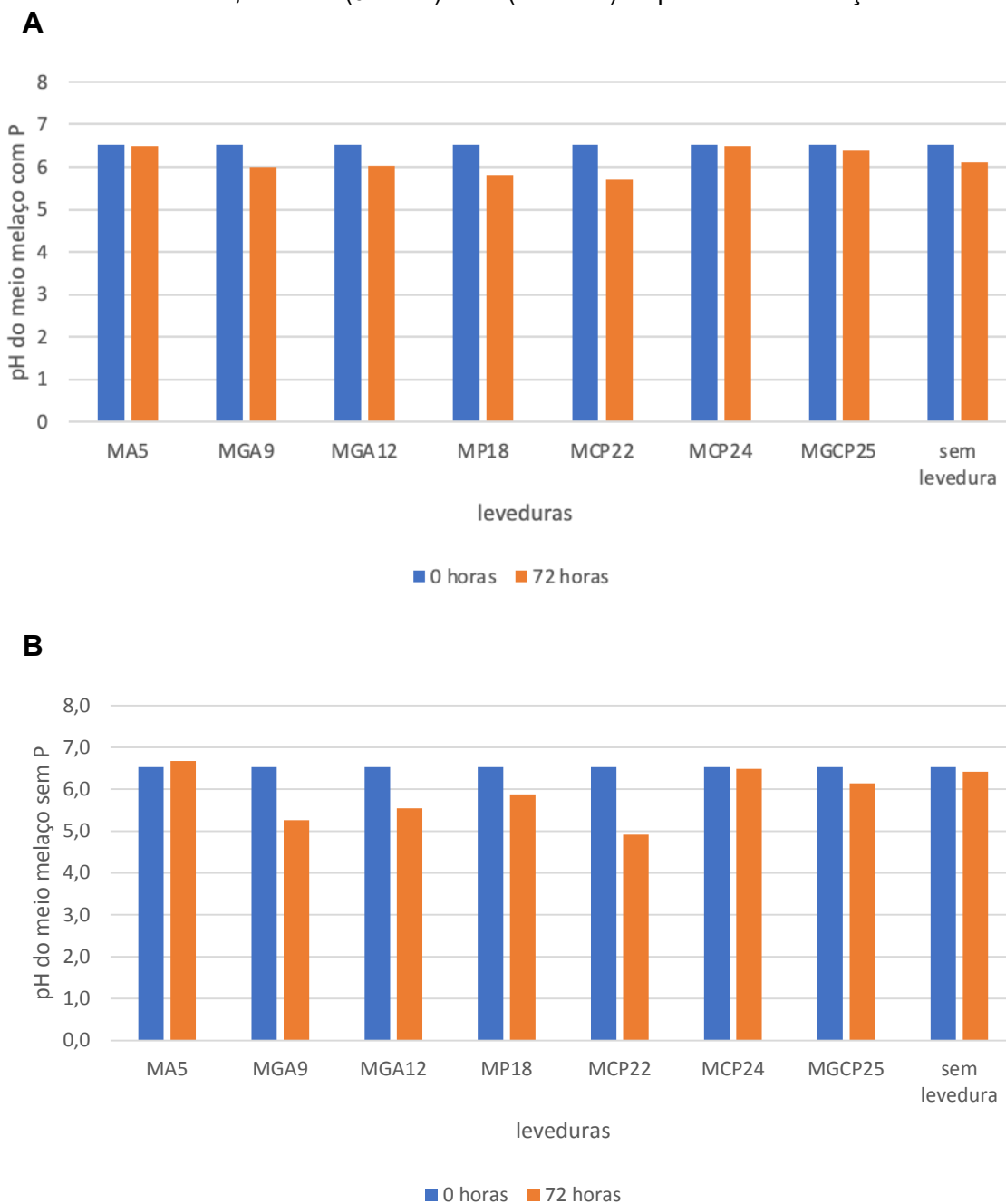
A solubilização de fosfato insolúvel aumentou com o período de incubação e houve uma estabilização e queda gradual. Segundo Gaind; Gaur (1991), essa diminuição da solubilização depois de um certo período de incubação pode ocorrer devido à perda dos elementos essenciais dos nutrientes, aumento da produção de metabólitos tóxicos no crescimento e/ou devido à autólise das células. A diminuição do pH do meio de cultura pode ser devida à secreção de ácidos orgânicos que ocorre durante o metabolismo da glicose, mecanismo atribuído pela dissolução do fosfato inorgânico insolúvel (CHEN *et al.*, 2006).

Figura 18. Valores de pH no meio de cultura NBRIP com adição (A) ou não (B) de fosfato tricálcico, no início (0 horas) e fim (72 horas) do período de incubação.



Fonte: Elaborado pela própria autora (2022).

Figura 19. Valores de pH no meio de cultura de melação, com adição (A) ou não (B) de fosfato tricálcico, no início (0 horas) e fim (72 horas) do período de incubação.



Fonte: Elaborado pela própria autora (2022).

5. Conclusões

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que dentre as leveduras testadas, as linhagens MG9 e MCP22, ambas identificadas como da espécie *T. delbrueckii*, se destacaram, com produção de AIA nos dois meios testados, até mesmo na ausência de triptofano no meio BD. Resultados similares foram obtidos para a linhagem MP18 (*T. globosa*), que na ausência de triptofano em meio BD,

produziu 18,1 µg/mL de AIA, em 48 horas, mas com triptofano alcançou a produção de 378,6 µg/mL de AIA no mesmo período de incubação. As linhagens MGA12 (*C. pseudointermedia*), MCP24 (*T. asahii*) e MGCP25 (*C. laurentii*) apresentaram maior produtividade de AIA em meio de melão.

Para todas as linhagens avaliadas, o meio de cultura NBRIP ofereceu as melhores condições para a solubilização do fosfato tricálcico do que o meio de melão, com exceção para a linhagem MA5 (*A. melanogenum*) que não solubilizou o fosfato tricálcico nas condições utilizadas nos ensaios. A solubilização observada foi ocasionada pela produção de ácidos orgânicos pelas leveduras, comprovado pela queda no pH do meio. O melão clarificado utilizado como meio de cultura mais acessível e de baixo custo é viável apenas para avaliar a produção de AIA pelas leveduras, enquanto para a solubilização de fosfato, sua composição nutricional prejudica os resultados dessa análise.

6. Literatura citada

AZCÓN-BIETO, J.; TALÓN, M. **Fundamentos de fisiologia vegetal**. Barcelona: McGraw-Hill/Interamericana de España and Edicions Universitat, 2008.

BARTON, M. D.; DELNERI, D.; OLIVER, S. G.; RATTRAY, M.; BERGMAN, C. M. Evolutionary systems biology of amino acid biosynthetic cost in yeast. **PLoS One**, v. 5, e11935, 2010.

BUNSANGIAM, S.; SAKPUNTOON, V.; SRISUK, N.; OHASHI, T.; FUJIYAMA, K.; LIMTONG, S. Biosynthetic pathway of indole-3-acetic acid in basidiomycetous yeast *Rhodospiridiobolus fluvialis*. **Mycobiology**, v. 47, p. 292-300, 2019.

CHEN, Y. P.; REKHA, P. D.; ARUN, A. B.; SHEN, F. T.; LAI, W. A.; YOUNG, C. C. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. **Applied Soil Ecology**, v. 34, p. 33-41, 2006.

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

DENG, Z. et al. Characterization of heavy metal-resistant endophytic yeast *Cryptococcus* sp. CBSB78 from rapes (*Brassica chinensis*) and its potential in promoting the growth of *Brassica* spp. in metal-contaminated soils. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 223, p. 5321-5329, 2012.

DIMENNA, M. E. The isolation of yeasts from soil. **Journal of General Microbiology**, v. 17, p. 678-688, 1957.

EL-TARABILY, K. A. Suppression of *Rhizoctonia solani* diseases of sugar beet by antagonistic and plant growth-promoting yeasts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 69-75, 2004.

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

GAIND, S.; GAUR, A. C. Thermotolerant phosphate solubilizing microorganisms and their interaction with mung-bean. **Plant Soil**, v. 133, p.141-149, 1991.

GORDON, S. A.; WEBER, R. P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**, v. 26, p. 192-195, 1951.

GROSSMANN, K. Auxin herbicides: current status of mechanism and mode of action. **Pest Management Science**, v. 66, p. 113-120, 2010.

HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; CORDERO-BUESO, G.; RUIZ-MUÑOZ, M.; CANTORAL, J. M. Culturable yeasts as biofertilizers and biopesticides for a sustainable agriculture: a comprehensive review. **Plants**, v. 10, p. 822, 2021.

HINSINGER, P. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. **Plant and Soil**, v. 237, p. 173-195, 2001.

KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; AHMAD, E. Mechanism of phosphate solubilization and physiological functions of phosphate-solubilizing microorganisms. In: KHAN, M.; ZAIDI, A.; MUSARRAT, J. (eds). **Phosphate solubilizing microorganisms: principles and application of microphos technology**. Springer International Publishing, p. 31-62, 2014.

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

LIU, Y. Y.; CHEN, H. W.; CHOU, J. Y. Variation in indole-3-acetic acid production by wild *Saccharomyces cerevisiae* and *S. paradoxus* strains from diverse ecological sources and its effect on growth. **PLoS One**, v. 11, n. 8, e0160524, 2016.

MUJAHID, M. D.; SASIKALA, C. H.; RAMANA, V. Production of indole-3-acetic acid and related indole derivatives from l-tryptophan by *Rubrivivax benzoatilyticus* JA2. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, p. 1001-1008, 2011.

MUNDRA, S.; ARORA, R.; STOB DAN, T. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel temperature, pH, and salt-tolerant yeast, *Rhodotorula* sp. PS4, isolated from seabuckthorn rhizosphere, growing in cold desert of Ladakh, India. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 2387-2396, 2011.

NAKAYAN, P.; HAMEED, A.; SINGH, S.; YOUNG, L. S.; HUNG, M. H.; YOUNG, C. C. Phosphate-solubilizing soil yeast *Meyerozyma guilliermondii* CC1 improves maize (*Zea mays* L.) productivity and minimizes requisite chemical fertilization. **Plant and Soil**, v. 373, n. 1/2, p. 301-315, 2013.

NASSAR, A. H.; EL-TARABILY, K. A.; SIVASITHAMPARAM, K. Promotion of plant growth by an auxin producing isolate of the yeast *Williopsis saturnus* endophytic in maize (*Zea mays* L.) roots. **Biology and Fertility of Soils**, v. 42, p. 97-108, 2005.

NOVAIS, R. F.; SMITH, T. J. **Fósforo em solo e planta em condições tropicais**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 399 p. 1999.

NUTARATAT, P.; SRISUK, N.; ARUNRATTIYAKORN, P.; LIMTONG, S. Plant growth promoting traits of epiphytic and endophytic yeasts isolated from rice and sugar cane leaves in Thailand. **Fungal Biology**, v. 118, p. 683-94, 2014.

OLIVEIRA, T. **Leveduras produtoras de AIA e solubilizadoras de P visando a promoção de crescimento de tomateiro**. 65 f. Dissertação. Universidade Federal de São Carlos, 2016.

RAO, R. P.; HUNTER, A.; KASHPUR, O.; NORMANLY, J. Aberrant synthesis of indole-3-acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae* triggers morphogenic transition, a virulence trait of pathogenic fungi. **Genetics**, v. 185, p. 211-220, 2010.

SCOTT, J. C.; GREENHUT, I. V.; LEVEAU, H. J. Functional characterization of the bacterial iac genes for degradation of the plant hormone indole-3-acetic acid. **Journal of Chemical Ecology**, v. 39, p. 942-951, 2013.

SHIN, M.; SHINGUU, T.; SANO, K.; UMEZAWA, C. Metabolic fates of L-tryptophan in *Saccharomyces uvarum* (*Saccharomyces carlsbergensis*). **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, p. 1792-1795, 1991.

SINDHU, S. S.; SEHRAWAT, A. Rhizosphere microorganisms: application of plant beneficial microbes in biological control of weeds. In: PANPATTE, D.G.; JHALA, Y.K.; VYAS, R.V.; SHELAT, H.N. **Microorganisms for green revolution: microorganisms for sustainability**. Singapore: Springer, p. 391-430, 2017.

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

SUN, P. F. et al. Indole-3-acetic acid-producing yeasts in the phyllosphere of the carnivorous plant *Drosera indica* L. **PLoS One**, v. 9, n. 12, p. 114-196, 2014.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 719p., 2004.

TEALEET, W. D.; PAPONOV, I. A.; PALME, K. Auxin in action: signaling, transport and the control of plant growth and development. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, p. 847-859, 2006.

TROMAS, A.; PERROT-RECHENMANN, C. Recent progress in auxin biology. . **Comptes Rendus Biologies**, v. 333, p. 297-306, 2010.

XIN, G.; GLAWE, D.; DOTY, S. L. Characterization of three endophytic, indole-3-acetic acid producing yeasts occurring in *Populus trees*. **Mycological Research**, v. 3, p. 973-980, 2009.

Capítulo 3. Germinação e desenvolvimento inicial de milho tratado com células ou metabólitos de leveduras de solo

1. Resumo

O emprego de produtos biológicos no tratamento de sementes que estimulam a associação entre as plantas e microrganismos benéficos tem crescido nos últimos anos, possibilitando aos produtores a substituição de produtos químicos tóxicos, tornando a agricultura uma atividade mais sustentável, em termos ambientais e econômicos. A inoculação de sementes com diferentes grupos microbianos tem sido estudada com destaque às rizobactérias. As leveduras, porém, apresentam potencial ainda pouco explorado. Com isso, o objetivo do trabalho foi avaliar a germinação e desenvolvimento inicial do milho através da inoculação e tratamento de sementes de milho com células ou metabólitos de leveduras isoladas de solo, sob cultivo de milho orgânico. Para tanto, as sementes (sem tratamento com fungicida), foram desinfetadas e tratadas com a imersão em suspensão de células ou filtrado do cultivo da levedura livre de células (em condições pré-estabelecidas que favorecem a produção de AIA em caldo batata ou melação), definido como 'metabólito'. Os resultados obtidos para a germinação das sementes de milho mostraram que não houve diferença estatística entre os tratamentos. Os dados obtidos para o desenvolvimento da radícula e coleóptilo, porém, mostraram maior desenvolvimento nos tratamentos que empregaram metabólitos das linhagens MGA9 e MCP22, ambas linhagens da espécie *Torulaspota delbrueckii*. Para o coleóptilo, os metabólitos das linhagens MGA9 e MCP22 também se destacaram, sendo estatisticamente superiores ao controle (água). As linhagens MCP22 e MGA9, contrariamente, foram os tratamentos que resultaram nas plantas (após cultivo por 12 dias em vaso) com menor parte aérea. Para a raiz, o emprego de células da linhagem MCP22, e das células e metabólitos de MA5 (*Aureobasidium melanogenum*) foram as que apresentaram os melhores resultados de massa seca, apesar de o tratamento com a linhagem MA5 apresentar as menores radículas na primeira avaliação. Conclui-se que a aplicação das células/metabólitos das linhagens de levedura apresentou efeito significativo no desenvolvimento inicial de milho. É necessário, porém, estudos mais aprofundados para que se consiga obter os melhores resultados quanto ao desenvolvimento vegetal, definindo a melhor

concentração celular com a caracterização do metabólito e avaliando os métodos de tratamento.

2. Introdução

Os microrganismos promotores de crescimento vegetal possuem capacidade de estimular a germinação e o desenvolvimento de plantas, beneficiando essa interação através da maior absorção de nutrientes e compostos no solo, produção de fitormônios e antibiose (TSAVKELOVA *et al.*, 2007). Os fitormônios são fundamentais para vários aspectos da fisiologia da planta, como a germinação de sementes, formação de raízes, formação de flores e frutos e senescência (TSAVKELOVA *et al.*, 2007).

A auxina é um hormônio importante que está relacionado à estimulação do crescimento vegetal e pertencente a este grupo, o ácido indolacético (AIA) é a substância mais encontrada nas plantas, promovendo o alongamento celular e regulando o crescimento vegetal (NUTARATAT *et al.*, 2014). Altas concentrações de AIA causam efeito inibitório nos processos fisiológicos das plantas, inibindo a germinação de sementes (SINDHU; SEHRAWAT, 2017) e o crescimento da planta.

Os altos níveis de AIA estimulam a produção de etileno devido ao aumento da atividade da aminociclopropano-1-carboxílico sintase (ACC sintase), causando anormalidades no crescimento e senescência. Altos níveis de AIA e a alta produção de ácido abscísico (ABA) causam respostas fitotóxicas na planta, atuando como herbicidas, por isso, o AIA é sintetizado nas plantas de forma natural em níveis baixos ou quando são associados a microrganismos (GROSSMANN, 2010).

Microrganismos capazes de produzir AIA estão cada vez mais sendo estudados para serem utilizados como biofertilizantes, pois acredita-se que esses microrganismos podem aumentar o crescimento e comprimento da raiz, ou seja, ampliam a área de superfície da raiz, possibilitando o maior acesso aos nutrientes contidos no solo (FU *et al.*, 2016).

A inoculação de sementes com cepas de leveduras tem mostrado efeitos positivos no aumento da germinação e crescimento da planta e aumento da produtividade da fotossíntese (AMPRAYN *et al.*, 2012; AGAMY *et al.*, 2013; NASSAR *et al.*, 2005). As leveduras com capacidade de produção de AIA são importantes para a promoção do crescimento e do desenvolvimento das plantas (EL-TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2006).

No estudo de Mukherjee e Sen (2014), a cepa SSm-39 de *Candida tropicalis* aumentou tanto o crescimento como a produtividade do milho, quando comparada ao controle. De acordo com Fu *et al.* (2016), as características relacionadas à promoção do crescimento das plantas pelos microrganismos estão relacionadas com a capacidade deles em produzir AIA, e as leveduras produtoras de AIA podem exercer efeitos morfofisiológicos positivos tanto na parte aérea quanto nas raízes das plantas. Dessa maneira, mais estudos são necessários para desenvolver produtos biotecnológicos e assim reduzir os custos e os impactos ambientais, além de tornar a agricultura mais sustentável. Com isso, o objetivo desse trabalho foi avaliar a germinação e o desenvolvimento inicial de milho inoculado com as células e metabólitos das leveduras de solo selecionadas.

3. Material e Métodos

3.1. Material biológico

Para o ensaio do tratamento de sementes de milho com as leveduras selecionadas, foi utilizada a cultivar P3898, cedida pelo Instituto Agrônomo de Campinas. As sementes utilizadas não apresentavam tratamento com fungicida para evitar interferência nos resultados de inoculação das leveduras. As sementes foram desinfetadas por imersão em álcool 70% por 2 minutos e hipoclorito de sódio a 1% durante 15 minutos, seguido por lavagens sucessivas com água destilada esterilizada (BHATTACHARYYA *et al.*, 2015), secas ao ar, e logo em seguida utilizadas nos ensaios.

As linhagens de leveduras utilizadas nos testes foram a MGA9 (*Torulaspora delbrueckii*), MP18 (*Torulaspora globosa*), MCP22 (*Torulaspora delbrueckii*), MA5 (*Aureobasidium melanogenum*), MGA12 (*Candida pseudointermedia*), MCP24 (*Trichosporon asahii*) e MGCP25 (*Cryptococcus laurentii*). As leveduras foram mantidas em tubo de ensaio, em meio de cultura YPD inclinado, cobertas com óleo mineral, e armazenadas em geladeira (4°C) até o início dos testes.

3.2. Preparo do inóculo e metabólito para o tratamento das sementes de milho

Para o preparo do inóculo de levedura, estas foram repicadas em placas de Petri com meio YPD sólido e incubadas em BOD a 30°C até o desenvolvimento das colônias. Após o crescimento, foi retirada uma alçada das colônias e transferida para

dois Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de meio mantidos sob agitação de 160 rpm, a 30°C. O inóculo de cada levedura foi preparado de acordo com o seu melhor desempenho no crescimento celular (estatisticamente superior) considerando o meio (BD ou melaço) obtido no menor tempo de análise (resultados apresentados no Capítulo 2). As condições escolhidas para cada levedura estão dispostas na Tabela 1.

Tabela 1. Condições utilizadas para cada linhagem de levedura a partir dos resultados anteriores de crescimento e produção de AIA.

| Linhagem levedura | Meio de cultura (com triptofano) | Tempo (horas) | Crescimento (600 nm) | Concentração de AIA (µg/mL) |
|--------------------------|---|----------------------|-----------------------------|------------------------------------|
| MA5 | caldo batata | 36 | 7,84 | 110,15 |
| MGA9 | melaço | 48 | 7,93 | 357,82 |
| MGA12 | melaço | 24 | 4,20 | 199,97 |
| MP18 | melaço | 36 | 6,82 | 318,81 |
| MCP22 | caldo batata | 36 | 8,34 | 310,71 |
| MCP24 | melaço | 36 | 8,02 | 34,97 |
| MGCP25 | melaço | 36 | 7,87 | 21,03 |

Cada linhagem foi cultivada utilizando o meio de cultura e o tempo de incubação referente a cada linhagem como exposto na Tabela 1. O cultivo foi realizado em triplicata. Após o cultivo, o conteúdo dos frascos foi misturado em uma única amostra, em seguida as amostras foram quantificadas em câmara de Neubauer e padronizadas para 1×10^8 células/mL. Foi também avaliada a viabilidade celular após coloração das células com azul de metileno-citrato de sódio (LEE *et al.*, 1981) em câmara de Neubauer, para contagem de células viáveis e não-viáveis. A viabilidade (%) foi estimada com base na proporção de células viáveis em relação ao número total de células (que se manteve acima de 80% para todos os inóculos utilizados).

Um volume de 2 mL foi coletado e a determinação de AIA realizada após a reação de Salkowski em espectrofotômetro a 530 nm. A amostra foi diluída com água destilada para a padronização da concentração de AIA em 20 µg/mL. Com isso, foram separadas duas amostras para cada inóculo, uma contendo a suspensão com as células e a outra amostra foi centrifugada a 3000 rpm por 3 minutos. Para garantir ausência de células, o meio de cultivo após centrifugação foi filtrado em membrana de 0,22 µm. (definido como metabólito).

3.2. Tratamento das sementes

O tratamento das sementes de milho foi realizado em Erlenmeyers de 125 mL estéreis, com 25 sementes desinfetadas cada, contendo um volume de 35 mL do cultivo de leveduras (suspensão de células ou metabólito). Os controles consistiram no tratamento das sementes com água destilada estéril, meio de cultura BD estéril e meio de melação estéril.

Após a imersão das sementes nas suspensões ou metabólitos, os frascos foram mantidos em agitação de 100 rpm por uma hora, a temperatura ambiente. Em seguida as sementes foram dispostas em placas de Petri com papel filtro umedecido com água destilada estéril. Foram colocadas 5 sementes por placa, sendo 5 placas por tratamento. As placas foram incubadas por 7 dias a 28°C em BOD no escuro. Posteriormente foi realizada a quantificação das sementes germinadas, e nestas foi realizada a medição do comprimento da radícula e do coleótilo, com o uso de um paquímetro.

3.4. Transplante das sementes pré-germinadas para vaso

As sementes germinadas, obtidas a partir dos tratamentos realizados no ensaio anterior, foram transplantadas para vasos de 1 L, com o emprego de vermiculita como substrato. Foram transplantadas 10 sementes pré-germinadas por tratamento, as quais apenas receberam a adição diária de água destilada para manutenção da umidade do substrato. Os vasos foram mantidos em bancada, próxima à janela do laboratório, o qual proporcionava entrada de ar e iluminação plena. Os vasos permaneceram nesta condição por 12 dias, quando as plantas foram colhidas e avaliadas.

As análises consistiram na medição do comprimento da parte aérea, com o emprego de fita métrica. Além disso, foi realizada a determinação da massa seca da raiz com a secagem das raízes em estufa a 60°C até peso constante, aferido em balança analítica.

4. Resultados e Discussão

Os resultados obtidos para a germinação das sementes de milho mostraram que não houve diferença estatística entre os tratamentos (Figura 1). A porcentagem de germinação variou de 76% para os tratamentos com metabólito da linhagem MGA12 e células da linhagem MCP22, até 96% proporcionado pelo tratamento com

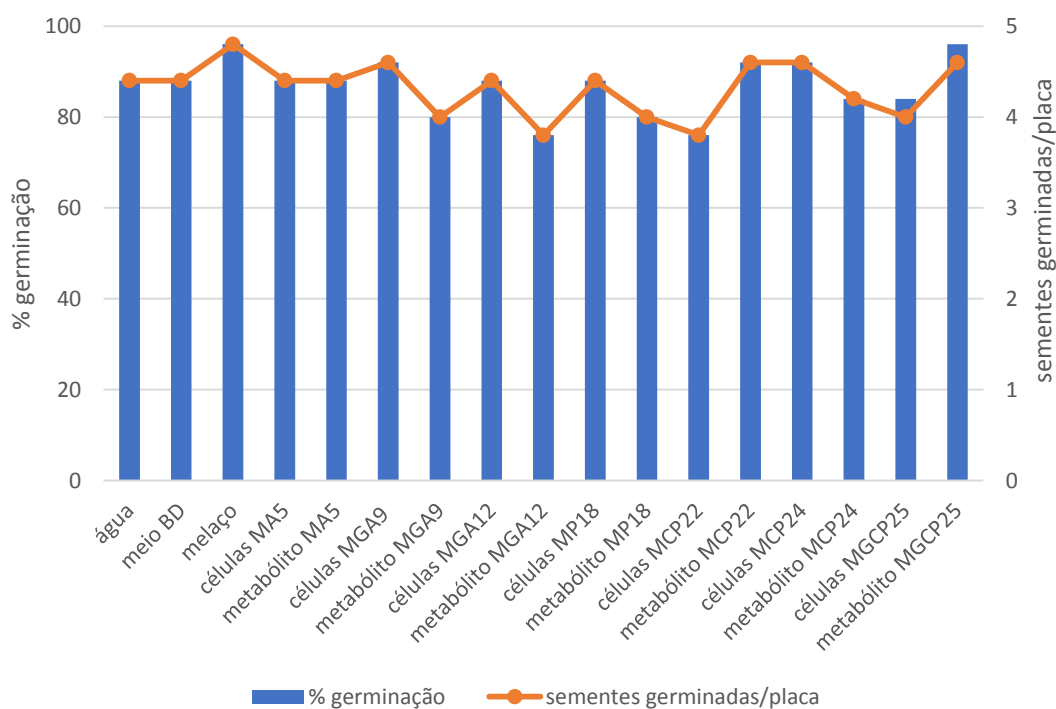
o metabólito da linhagem MGCP25. Para a maioria dos tratamentos a taxa de germinação foi de 88% (Figura 2).

Figura 1. Germinação *in vitro* de sementes de milho tratadas com células ou metabólitos das leveduras e os controles (água, meio BD e melaço). Primeira foto à esquerda ilustra a placa controle (água), a segunda foto sementes tratadas com metabólitos da linhagem MGA9 (*Torulaspora delbrueckii*) e a terceira foto, sementes tratadas com células da linhagem MGA9 (*Torulaspora delbrueckii*).



Fonte: Elaborado pela própria autora (2022).

Figura 2. Dados de germinação (%) e número de sementes de milho germinadas por placa. Sementes tratadas com células ou metabólitos das leveduras e os controles (água, meio BD e melaço).



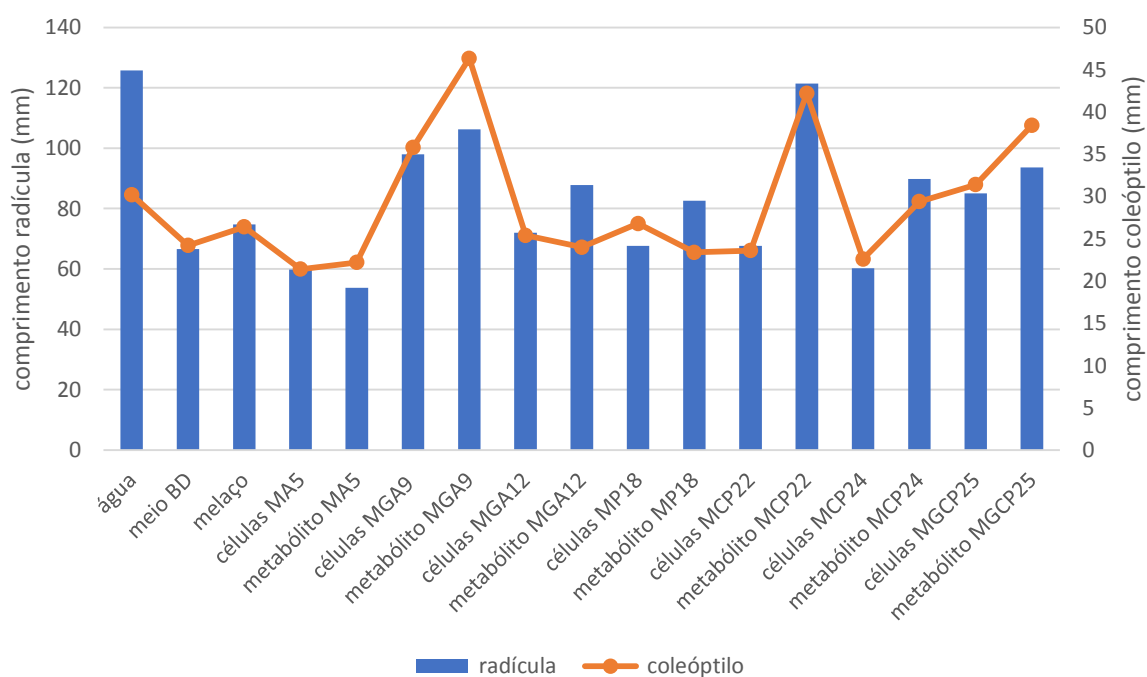
Fonte: Elaborado pela própria autora (2022).

Os dados obtidos para o desenvolvimento das primeiras raízes (radícula) e coleótilo de milho indicaram que houve maior desenvolvimento nos tratamentos que empregaram metabólitos das linhagens MGA9 e MCP22, ambas linhagens da espécie *T. delbrueckii* (Figura 3). Para o comprimento da radícula, porém, o tratamento controle com água destilada apresentou o mesmo desempenho, com o melhor resultado, indicando que para este parâmetro o emprego de leveduras não trouxe benefícios no momento da análise. Para o coleótilo, porém, os metabólitos das linhagens MGA9 e MCP22 (melaço e BD, respectivamente) se destacaram, sendo que os dados obtidos de MGA9 foram estatisticamente superiores ao controle (água) (Figura 3).

As plântulas com piores resultados de desenvolvimento após germinação foram dos tratamentos com células e metabólitos da linhagem MA5 (*Aureobasidium melanogenum*), para os dois parâmetros de análise (radícula e coleótilo) (Figura 3).

Os resultados obtidos na análise das plantas de milho, após transplante para os vasos, porém, indicaram que os bons resultados observados nas sementes pré-germinadas não se sustentaram após o desenvolvimento da planta em vaso (Figura 5).

Figura 3. Dados de comprimento de radícula e coleótilo de sementes germinadas de milho tratadas com células ou metabólitos de leveduras e os controles (água, meio BD e melaço).



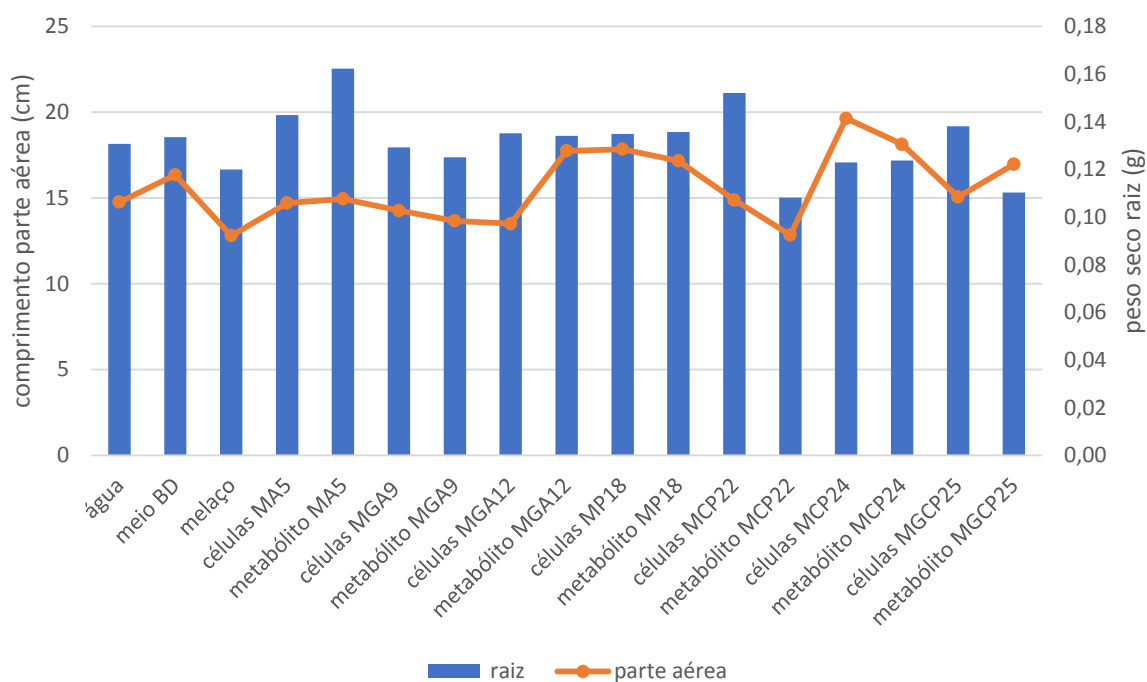
Fonte: Elaborado pela própria autora (2022).

Figura 4. Avaliação do desenvolvimento das plântulas de milho tratadas com células ou metabólitos das leveduras e os controles (água, meio BD e melaço). Primeira foto à esquerda ilustra as plântulas controle (água), a segunda foto, as plântulas das sementes tratadas com metabólitos da linhagem MP18 (*Torulaspora globosa*).



Fonte: Elaborado pela própria autora (2022).

Figura 5. Dados de comprimento da parte aérea e massa seca de raiz de plantas de milho (12 dias após transplante) derivadas de sementes tratadas com células ou metabólitos de leveduras e os controles.



Fonte: Elaborado pela própria autora (2022).

Os metabólitos das linhagens MCP22 e MGA9, provenientes do melaço, proporcionaram os melhores resultados para o desenvolvimento da radícula e coleóptilo, mas foram os tratamentos que resultaram nas plantas com menor

comprimento da parte aérea, ao lado do metabólito da linhagem MGA12. Para o parâmetro raiz, é possível observar que o metabólito da linhagem MCP22, que se destacou para o desenvolvimento de radícula, foi que apresentou plantas com menor massa seca de raiz. O emprego de células da linhagem MCP22, porém, ao lado das células e metabólitos de MA5 foram as que apresentaram os melhores resultados de massa seca de raiz. O tratamento com a linhagem MA5, contrariamente, apresentou as menores radículas na primeira avaliação das sementes após a germinação.

Os microrganismos capazes de promover o crescimento vegetal possuem mecanismo para o melhor desenvolvimento das raízes e dos pêlos radiculares, a fim de proporcionar a maior absorção de nutrientes (IDRIS *et al.*, 2007). Os resultados de Andrade (2020) apontaram que existe um mecanismo no qual as leveduras atuam, que influenciam positivamente a raiz da planta visando o maior crescimento vegetal, e corroboram com Idris *et al.* (2007), no fato que o maior desenvolvimento das raízes pode disponibilizar maior absorção de nutrientes e outros compostos para o desenvolvimento da planta.

No trabalho de Nakayan *et al.* (2013), as leveduras *M. guilliermondii* (CC1), *R. mucilaginosa* (CC2) e *M. caribbica* (CC3) isoladas de solo apresentaram capacidade de produzir AIA e solubilizar fosfato *in vitro*, e quando inoculadas em plantas de alface e milho apresentaram resultados positivos para o crescimento vegetal, altura da planta e massa seca de milho, comparado ao controle.

Este estudo forneceu uma avaliação inicial do potencial de algumas leveduras produtoras de AIA quanto às características de germinação de sementes de milho e desenvolvimento inicial de plântulas em condições *in vitro*. Estudos com bactérias promotoras de crescimento vegetal apresentam resultados controversos. Noumavo *et al.* (2013) apresentaram resultados positivos na inoculação de bactérias, com maior taxa de germinação de sementes. Para Selvakuma *et al.* (2009), a bactéria *P. fragi* (CS11RH1) apresentou capacidade de produção de AIA e aumentou a porcentagem e a taxa de germinação assim como a biomassa vegetal, consequentemente maior absorção de nutrientes nas plântulas de trigo.

A inoculação de leveduras para a promoção de crescimento vegetal ainda é pouco estudada, mas autores como Falih e Wainwright, (1995) e El-Tarabily e Sivasithamparam (2006) sugerem que as leveduras isoladas de solo podem ser utilizadas como bioinoculantes para beneficiar os processos nos solos. Resultados

baixos e/ou negativos quando comparadas ao tratamento controle podem indicar a incompatibilidade entre a planta e a levedura, pois nem sempre os microrganismos mostram constância/coerência nos resultados. Uma alternativa é que os microrganismos podem ativar o mecanismo de defesa na planta, devido à relação entre o patógeno e o hospedeiro, gerando maior gasto com recursos metabólicos do que para o seu crescimento (ANDRADE, 2020). Ainda são necessários mais estudos para caracterizar os fatores que influenciam a inoculação.

De acordo com Tabatabaei *et al.* (2016), a inibição causada pelas bactérias na germinação de sementes pode estar relacionada às altas concentrações de AIA ou a produção de alguns metabólitos ou devido ao estresse. As bactérias podem exibir efeitos inibitórios ou crescimento, dependendo da quantidade total de AIA (produzido pela bactéria + endógeno da planta) em condições ideais ou não.

5. Conclusões

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que os tratamentos com as diferentes linhagens de leveduras testadas não afetaram a germinação das sementes de milho de forma significativa. O emprego dos metabólitos das linhagens MGA9 (melaço) e MCP22 (caldo de batata), ambas linhagens da espécie *T. delbrueckii*, porém, afetaram o desenvolvimento do coleóptilo e radícula do milho. As mesmas linhagens, contrariamente, resultaram nas plantas (após cultivo por 12 dias em vaso) com menor parte aérea.

Para a raiz, o emprego de células da linhagem MCP22 e das células e metabólitos de MA5 (em caldo de batata) foram as que apresentaram os melhores resultados de massa seca, apesar de o tratamento com a linhagem MA5 apresentar as menores radículas na primeira avaliação.

Conclui-se que a aplicação das células/metabólitos das linhagens de levedura apresentou efeito significativo no desenvolvimento inicial de milho. É necessário, porém, estudos mais aprofundados para que se consiga obter os melhores resultados quanto ao desenvolvimento vegetal, definindo a melhor concentração celular, com a caracterização do metabólito, e avaliando os métodos de tratamento.

6. Literatura citada

AGAMY, R.; HASHEM, M.; ALAMRI, S. Effect of soil amendment with yeasts as bio-fertilizers on the growth and productivity of sugar beet. **African Journal of Agricultural Research**, v. 8, n. 1, p. 46-56, 2013.

AMPRAYN, K.; ROSE, M. T.; KECSKÉS, M.; PEREG, L.; NGUYEN, 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.

ANDRADE, K. M. **Isolamento, caracterização e seleção de leveduras promotoras de crescimento vegetal**. 102 f. Tese, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2020.

BHATTACHARYYA, D.; GARLADINNE, M.; LEE, Y. H. Volatile indole produced by *Rhizobacterium proteus vulgaris* JBLS202 stimulates growth of *Arabidopsis thaliana* through auxin, cytokinin, and brassinosteroid pathways. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 34, n.1, p. 158-168, 2014.

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, n. 1, p.25-35, 2006.

FALIH, A. M.; WAINWRIGHT, M. Nitrification, S-oxidation and P-solubilization by the soil yeast *Williopsis californica* and by *Saccharomyces cerevisiae*. **Mycological Research**, v. 99, p. 200-204, 1995.

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

GROSSMANN, K. Auxin herbicides: current status of mechanism and mode of action. **Pest Management Science**, v. 66, p. 113-120, 2010.

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.

LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H. Y.; Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, v. 11, p. 641-649, 1981.

MUKHERJEE, S.; SEN, S. K. Exploration of novel rhizosphere yeast isolate as fertilizing soil inoculant for improvement of maize cultivation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, p. 1494-1499, 2014.

NAKAYAN, P.; HAMEED, A.; SINGH, S.; YOUNG, L. S.; HUNG, M. H.; YOUNG, C. C. Phosphate-solubilizing soil yeast *Meyerozyma guilliermondii* CC1 improves maize (*Zea mays* L.) productivity and minimizes requisite chemical fertilization. **Plant and Soil**, v. 373, n. 1/2, p. 301-315, 2013.

NASSAR, A. H.; EL-TARABILY, K. A.; SIVASITHAMPARAM, K. Promotion of plant growth by an auxin producing isolate of the yeast *Williopsis saturnus* endophytic in maize (*Zea mays* L.) roots. **Biology and Fertility of Soils**, v. 42, p. 97-108, 2005.

NOUMAVO, P. A.; KOCHONI, E.; DIDAGBÉ, Y. O.; ADJANOHOOUN, A.; AL-LAGBÉ, M.; SIKIROU, R.; GACHOMO, E. W.; KOTCHONI, S. O.; BABAMOUSA, L. Effect of different plant growth promoting rhizobacteria on maize seed germination and seedling development. **American Journal of Plant Sciences**, v. 4, p. 1013-1021, 2013.

NUTARATAT, P.; SRISUK, N.; ARUNRATTIYAKORN, P.; LIMTONG, S. Plant growth promoting traits of epiphytic and endophytic yeasts isolated from rice and sugar cane leaves in Thailand. **Fungal Biology**, v. 118, p. 683-94, 2014.

SELVAKUMAR, G.; JOSHI, P.; NAZIM, S.; MISHRA, P. K.; BISHT, J. K.; GUPTA, H. S. Phosphate solubilization and growth promotion by *Pseudomonas fragi* CS11RH1 (MTCC 8984), a psychrotolerant bacterium isolated from a high-altitude Himalayan rhizosphere. **Biologia**, v. 64, p. 239-245, 2009.

SINDHU, S. S.; SEHRAWAT, A. Rhizosphere microorganisms: application of plant beneficial microbes in biological control of weeds. In: PANPATTE, D.G.; JHALA, Y.K.; VYAS, R.V.; SHELAT, H.N. **Microorganisms for green revolution: microorganisms for sustainability**. Singapore: Springer, p. 391-430, 2017.

TABATABAEI, S.; EHSANZADEH, P.; ETESAMI, H.; ALIKHANI, H. A.; GLICK, B. R. Indole-3-acetic acid (IAA) producing *Pseudomonas* isolates inhibit seed germination and α -amylase activity in durum wheat (*Triticum turgidum* L.). **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 14, n. 1, e0802, 2016.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O emprego de microrganismos promotores de crescimento vegetal (MPCV) na agricultura tem sido cada vez mais considerado dentre as práticas de manejo empregadas para incremento da produtividade. A aplicação de microrganismos ou seus metabólitos têm direcionado as práticas agrícolas para a diminuição do emprego de insumos químicos, com a diminuição dos custos de produção, além da redução do impacto ambiental devido à contaminação dos solos e corpos d'água. Diversos estudos mostram que a associação entre os microrganismos e as plantas também podem proporcionar o aumento da resistência vegetal contra estresses bióticos e abióticos, inclusive àqueles relativos às mudanças climáticas.

Considerando o exposto, os estudos de prospecção de microrganismos de solo, com potencial de promoção de crescimento vegetal, se mostram fundamentais para o fomento desta área. Este estudo teve como objetivo o isolamento, seleção e caracterização de leveduras, um grupo que, dentre os MPCV, é o menos estudado e empregado atualmente para esse fim. Apesar disso, as leveduras são organismos de fácil cultivo, resistentes a variações do meio e muito utilizadas em diversos processos biotecnológicos. Vários estudos na literatura indicam o potencial de emprego das leveduras na agricultura. Atualmente, no Brasil, não há produtos comerciais disponíveis a base de leveduras para a agricultura, o que motiva os estudos.

Neste trabalho foram isoladas 28 linhagens de levedura de amostras de solo, sendo que destas, 23 apresentaram capacidade de produzir AIA, solubilizar fosfato e controlar dois fitopatógenos *in vitro*. Sete linhagens foram selecionadas por também se desenvolverem bem em meio de melaço, um subproduto da agroindústria canavieira, e que pode devido ao seu baixo custo, viabilizar a multiplicação da levedura e a produção de metabólitos de interesse, como o AIA. Os resultados obtidos no trabalho mostram que as linhagens MCP22 e MGA9, identificadas como sendo da espécie *Torulaspota delbrueckii*, se destacaram quanto à produção de AIA, inclusive no meio de melaço, e na solubilização de fosfato em meio NBRIP. O tratamento de sementes de milho com metabólitos dessas linhagens mostrou maior desenvolvimento do coleóptilo e radícula do milho após a germinação.

De forma geral, a aplicação das células/metabólitos das linhagens de levedura nas sementes de milho proporcionou efeito significativo no desenvolvimento inicial da planta. Estudos mais aprofundados, porém, são

necessários, para que se consiga avaliar a melhor concentração celular, o melhor método de inoculação que proporcione melhor interação entre o microrganismo e a planta. Além disso, é imperativo que seja feita a caracterização química do metabólito, com a quantificação de moléculas de interesse que podem ter sido excretadas pelo microrganismo no meio, e que podem beneficiar o desenvolvimento vegetal.