

Luiza de Almeida Campos

**CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS PROMOTORAS
DO CRESCIMENTO DE PLANTAS**

Trabalho de Conclusão de
Curso apresentado ao curso de
graduação em Ciências Biológicas
da Universidade Federal de Santa
Catarina como requisito para a
obtenção de grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Admir
José Giachini.

Florianópolis

2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da
UFSC.

Campos, Luiza

Caracterização de leveduras promotoras do
crescimento de plantas / Luiza Campos ; orientador,
Admir Giachini, 2017.

48 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de
Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas,
Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Leveduras promotoras
do crescimento de plantas . 3. estresses abióticos.
4. nodulação. I. Giachini, Admir . II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências
Biológicas. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais por todo o incentivo (mesmo que indireto) que recebi desde criancinha e que me fizeram amar a biologia e estar onde estou hoje; pelo amor e apoio incondicional nos momentos bons e nos ruins e por nunca desistirem de mim. Amo vocês!

Ao o meu orientador prof. Admir por todo o conhecimento, orientações e correções durante todo o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Francisco, por me ceder parte dos dados do seu doutorado e me orientar nos experimentos durante o tempo que ficou aqui no Brasil e à Maria que também me auxiliou bastante durante o pouco tempo que ficou por aqui.

A todo o pessoal do laboratório por toda a ajuda que me deram com qualquer coisa que eu precisasse e pelos momentos de descontração. Paola que fez um pouco do papel do Francisco quando era preciso, Ana Paula que me ajudou na montagem dos ensaios e sempre dividiu comigo as mesmas dúvidas e Shantau que me ajudou com a análise estatística e a montagem dos gráficos.

Aos meus amigos, aos de infância por terem me ajudado a ser quem eu sou hoje e aos da bio por terem compartilhado comigo todos esses anos sempre com muito companheirismo, em especial aos que se formam junto comigo e estão nesse mesmo barco, dividindo as tensões, agonias, incertezas e alegrias!

Ao Ricardo, meu namorado, por sempre me ouvir com paciência, entender minha ausência em alguns momentos dos últimos meses e por todo o companheirismo durante todos esses anos de graduação.

Lembre-se de olhar para o alto, para as
estrelas, e não para baixo, para os seus pés.
(Stephen Hawking)

RESUMO

O ciclo de vida e crescimento de uma planta são controlados por diversos fitohormônios. Alguns micro-organismos possuem a capacidade de promover o crescimento da planta a partir de, por exemplo, produção de alguns desses fitohormônios, solubilização de nutrientes do solo e proteção contra danos causados por estresses abióticos. Dentre esses estresses estão a salinidade e as secas. Esses micro-organismos são chamados de micro-organismos promotores do crescimento de plantas e, quando inoculados as plantas na forma de biofertilizantes, compõem uma alternativa sustentável ao uso de substâncias químicas como agrotóxicos em plantações. As leveduras que possuem capacidade de promover o crescimento da planta ainda são pouco estudadas. Este trabalho teve como objetivo avaliar leveduras, coletadas de diferentes ambientes, que possuem potenciais características promotoras do crescimento de plantas. As leveduras foram caracterizadas bioquimicamente e algumas delas foram testadas em ensaios em plantas para a avaliação das suas capacidades como potencializadoras da nodulação por *Rhizobium tropici* 899 em *Phaseolus vulgaris* e protetoras dos danos causados pelo estresse salino em *Oryza sativa* e estresse hídrico em *Solanum lycopersicum*. As leveduras não tiveram efeito na potencialização da nodulação em *P. vulgaris*. No combate aos danos causados por estresse abióticos, *Issatchenkia orientalis* e *Candida intermedia* tiveram efeitos positivos significativos nas plantas apenas quando o estresse não era levado em consideração no ensaio com *O. sativa*, e *Sarocladium kiliense* mostrou-se promissora no combate aos danos causados pelo estresse hídrico em *S. lycopersicum*. Estudos mais aprofundados são necessários, assim como ensaios em plantas com as outras leveduras caracterizadas bioquimicamente mostram-se promissores.

Palavras-chave: Micro-organismos promotores do crescimento de plantas. AIA. Fitohormônios. Solubilização de nutrientes. Sideróforos. Agrotóxicos. Compostos bioativos. Estresses abióticos. Salinidade. Estresse hídrico. Nodulação. *Phaseolus vulgaris*. *Oryza sativa*. *Solanum lycopersicum*.

ABSTRACT

The life cycle and growth of a plant are controlled by several phytohormones. Some microorganisms have the ability to promote plant growth from, for example, production of some of these phytohormones, solubilization of soil nutrients and protection against damage caused by abiotic stresses. Among these stresses are salinity and drought. These microorganisms are known as plant growth promoting microorganisms and, when inoculated in the form of biofertilizers, make up a sustainable alternative to the use of chemical substances such as pesticides in plantations. The yeasts that have the capacity to promote plant growth are still poorly studied. This work had as objective to evaluate yeasts, collected from different environments, which have potential plant growth promoting characteristics. The yeasts were characterized biochemically and some of them were tested in plants trials to evaluate their capacity as potentiators of *Rhizobium tropici* 899 nodulation in *Phaseolus vulgaris* and protect against damage caused by saline stress in *Oryza sativa* and drought stress in *Solanum lycopersicum*. The yeasts had no effect on potentiation of nodulation in *P. vulgaris*. Against the damage caused by abiotic stress, *Issatchenkia orientalis* and *Candida intermedia* had positive effects on plants only when stress was not taken into account in the trial with *O. sativa* and *Sarocladium kiliense* was promising as a protector of *S. lycopersicum* against the damages caused by drought stress. Further studies are needed, as well as trials in plants using the other biochemically characterized yeasts show up promising.

Keywords: Plant Growth Promoting Microorganisms. IAA. Phytohormones. Nutrient Solubilization. Siderophores. Pesticides. Bioactive Compounds. Abiotic stresses. Salinity. Drought stress. Nodulation. *Phaseolus vulgaris*. *Oryza sativa*. *Solanum lycopersicum*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Médias dos pesos secos de caule de feijão.....	29
Figura 2 - Médias dos pesos secos de raiz de feijão.....	30
Figura 3 - Médias do número de nódulos de feijão	31
Figura 4 - Comparação entre plantas de arroz 1.....	32
Figura 5 - Comparação entre plantas de arroz 2.....	32
Figura 6 - Médias dos pesos secos de caule de arroz	33
Figura 7 - Médias dos pesos secos de raiz de arroz	34
Figura 8 - Comparação entre plantas tomate 1.....	35
Figura 9 - Comparação entre plantas tomate 2.....	35
Figura 10 - Médias dos pesos secos de caule de tomate	36
Figura 11 - Médias dos pesos secos de raiz de tomate	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados caracterização bioquímica	28
---	----

SUMÁRIO

1 – Introdução.....	13
1.2 Objetivos	18
1.2.1 Objetivo geral.....	18
1.2.2 Objetivos específicos.....	18
2- Material e métodos.....	19
2.1 Coleta e isolamento das leveduras.....	19
2.2 Caracterização bioquímica	19
2.2.1 Produção de AIA	19
2.2.2 Produção de sideróforos	19
2.2.3 Solubilização de Fosfato	20
2.2.4 Produção de Lipase	20
2.2.5 Produção de Protease	20
2.2.6 Produção de Celulase	20
2.4. Ensaio de promoção de crescimento de plantas.....	21
2.4.1 Preparo do inoculante.....	21
2.4.2 Efeito das leveduras na nodulação por rizóbio.....	21
2.4.3 Ensaio em plantas com presença de estresse abiótico.....	22
2.4.3.1 - Arroz e estresse salino	22
2.4.3.2 Tomate e estresse hídrico	23
2.5 Análise estatística	24
3- Resultados.....	24
3.1 Isolamento das leveduras	24
3.2 Caracterização bioquímica	24
3.2 Identificação	27
3.3 Ensaio de promoção de crescimento de plantas.....	27
3.3.1 Efeito das leveduras na nodulação por rizóbio.....	27
3.3.2 Ensaio em plantas com presença de estresse abiótico.....	29
3.3.2.1 Arroz e estresse salino.....	29
3.3.2.2 Tomate e estresse hídrico	32
4- Discussão.....	35
4.1 Caracterização bioquímica	35
4.2 Ensaio de nodulação.....	37
4.3 Arroz e estresse salino.....	37
4.4 Tomate e estresse hídrico	39
5- Conclusões	41
6- Considerações finais.....	41
Referências.....	42

1 – Introdução

O ciclo de vida de uma planta é controlado por diversos fatores exógenos e endógenos. Os fatores exógenos são a temperatura, luz, água e nutrição mineral, e os fatores endógenos são os fitohormônios. Os fitohormônios são substâncias produzidas pelas plantas que promovem respostas fisiológicas. Eles também podem ser sintetizados pelo homem em laboratório e nesse caso são chamados de reguladores de crescimento (ARTECA, 1996). Os principais fitohormônios são os grupos de auxinas, giberelinas e citocininas e o etileno e ácido abscísico.

As auxinas foram o primeiro grupo de fitohormônios descoberto, sendo que o fitohormônio mais abundante nesse grupo é o ácido indolacético (AIA). Sua biossíntese ocorre primariamente em locais de divisão celular rápida, como meristema apical caulinar, folhas jovens, frutos em desenvolvimento e sementes. Também pode ser produzido em menores quantidades em folhas maduras e em ápices radiculares. Um dos seus precursores é o aminoácido triptofano. Quanto aos efeitos fisiológicos, as auxinas desempenham importante papel na divisão, crescimento e diferenciação celular. Elas estimulam a divisão celular nos meristemas apicais e no câmbio vascular, estimulam a expansão/alongamento celular e, após, induzem aumentos na absorção de solutos osmóticos e na atividade de enzimas relacionadas a biossíntese de polissacarídeos de parede para a continuidade do crescimento da célula, induzem a diferenciação de tecidos vasculares, controlam a dominância apical impedindo o crescimento de gemas axilares, promovem a formação do gancho apical em plântulas facilitando sua passagem através do solo e protegendo o meristema apical, estimulam a formação de raízes laterais, controlam juntamente com o etileno o processo de abscisão, controlam as respostas de fototropismo e geotropismo e possuem um papel ainda incerto na formação de flores (ARTECA, 1996; KERBAUY, 2004).

As giberelinas foram descobertas em detrimento de um fungo promotor do crescimento de plantas que produz giberelina que estava causando crescimento anormal nos arrozais do Japão no século XX, onde as plantas tombavam na água e os grãos eram perdidos. As giberelinas são sintetizadas em tecidos jovens da parte aérea da planta e em sementes em desenvolvimento. Em alguns casos seu precursor é o ácido mevalônico. Suas funções fisiológicas são, juntamente às auxinas, a estimulação do alongamento e divisão celular, promovem aumento da mitose nos meristemas subapicais de algumas plantas, induzem o

crescimento de alguns frutos e mobilizam reservas e atuam na germinação de cereais (ARTECA, 1996; KERBAUY, 2004).

As citocininas foram descobertas na década de 50 do século passado em experimentos envolvendo divisão celular em células de medula caulinar de fumo. Elas são sintetizadas em embriões de sementes em desenvolvimento, ápices caulinares, ápices de raízes e folhas jovens. As citocininas juntamente com as auxinas ativam a divisão celular regulando a atividade de ciclinas, estimulam a formação de gemas caulinares, retardam a senescência foliar e participam do crescimento de alguns frutos (ARTECA, 1996; KERBAUY, 2004).

O etileno é um hormônio gasoso produzido em todas as partes da planta. Geralmente regiões nodais e processos como abscisão de folhas, senescência de flores e amadurecimento de frutos apresentam uma produção mais elevada desse gás. Plantas submetidas a estresses como ferimentos, alagamentos, doenças, temperaturas inadequadas ou períodos de seca tendem a elevar a produção de etileno. Esse fitohormônio também pode ser produzido por bactérias, fungos, algas e musgos (ARTECA, 1996; KERBAUY, 2004).

O ácido abscísico (ABA) está bastante envolvido na resposta das plantas a estresses ambientais, mas também é importante no desenvolvimento e germinação de sementes. Ele é sintetizado a partir do metabolismo do carotenoide zeaxantina e, diferentemente dos outros fitohormônios, não possui uma forma sintética. Está presente em praticamente todas as células vivas da planta, desde o ápice caulinar ao radicular. Em condições de estresse o ABA regula a abertura dos estômatos, reduzindo assim a perda de água por transpiração. Na germinação de sementes o ABA promove o acúmulo de proteínas e lipídios de reserva, provoca a dormência de gemas, inibe a germinação precoce do embrião em frutos que ainda estão ligados a planta mãe (viviparidade) e protege contra ferimentos causados por herbivoria e injúrias mecânicas (ARTECA, 1996; KERBAUY, 2004).

Alguns micro-organismos (principalmente bactérias e fungos) possuem capacidades promotoras do crescimento de plantas. Esses micro-organismos colonizam interna e externamente órgãos de plantas e possuem a capacidade de estimular seu crescimento e aumentar sua produtividade, reduzindo os níveis de estresse causados por fatores bióticos e abióticos (SAHARAN; NEHRA, 2011).

Os benefícios promovidos por esses micro-organismos são recebidos pela planta de forma direta ou indireta. Os benefícios diretos são os que favorecem o crescimento da planta, como a produção de fitohormônios (principalmente auxinas e giberelinas), que complementa

a produção já realizada pela própria planta, aumentando sua velocidade de crescimento (EL-TARABLY, 2004); a solubilização de fosfato e outros nutrientes do solo, tornando-os mais disponíveis para a planta (NUTARATAT *et al.*, 2014); a produção de sideróforos, responsáveis por solubilizar o ferro presente no solo (ZLOCH *et al.*, 2016), e a formação de nódulos fixadores de nitrogênio nas raízes de plantas da família Fabaceae, além da potencialização da relação de simbiose que forma esses nódulos.

Quanto a nodulação em plantas da família Fabaceae, alguns micro-organismos promotores do crescimento de plantas como as bactérias do gênero *Rhizobium*, formam nódulos nas raízes onde realizam a fixação do nitrogênio deixando-o disponível para as plantas (SAHARAN; NEHRA, 2011). Já outros micro-organismos apenas potencializam a simbiose já existente entre a planta e as bactérias formadoras de nódulos e fixadoras de nitrogênio (SUBRAMANIAN *et al.*, 2015).

Os métodos indiretos essencialmente diminuem ou previnem danos causados à planta, como o combate a patógenos por meio da produção de compostos antibióticos e antifúngicos (IGNATOVA *et al.*, 2015) e a diminuição dos níveis de etileno e o consequente estímulo ao alongamento da raiz através da produção de 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminase (GLICK *et al.*, 2007), bem como o aumento da tolerância da planta frente a estresses abióticos (SAHARAN; NEHRA, 2011; YANG; KLOEPPER; RYU, 2009).

Temperaturas extremas, salinidade, secas, inundações e toxicidade de metais pesados são alguns dos estresses abióticos aos quais as plantas estão frequentemente expostas. Na agricultura esses estresses estão sendo cada vez mais acentuados pela atividade do homem e agem como fator limitante na produtividade das plantas (MAHAJAN *et al.*, 2005). Dentre esses estresses a salinidade (estresse salino) e as secas (estresse hídrico) são dois grandes problemas que afetam a produtividade de plantas.

O estresse hídrico, causado pela falta de chuvas limita o crescimento e a produtividade de lavouras. A água é essencial a vida da planta, ela faz o transporte de substâncias pelo vegetal, faz as células meristemáticas crescerem de tamanho, permite que um tecido ou um órgão se sustente, é responsável pelo resfriamento vegetal, age como isolante térmico, permite que órgãos e organelas se movimentem, estabiliza as estruturas de membranas e compostos e possui importante papel nas reações químicas. Na ausência de água no solo em situações de estresse hídrico a planta fecha seus estômatos, reduz a fotossíntese e a respiração e sofre interferência em muitos processos metabólicos básicos.

Em situações de desidratação intensa, o protoplasma se desorganiza e a maioria das plantas morre (KERBAUY, 2004).

Já a salinidade nos solos das plantações pode ser causada por sistemas de irrigação sem gerenciamento de drenagem. A falta de drenagem acarreta no acúmulo de sais na zona das raízes afetando, assim, a produtividade da planta (QADIR *et al.*, 2014). A salinidade também é problemática em cultivos irrigados, por exemplo de arroz, próximos ao mar. A água utilizada na irrigação desse tipo de cultivo usualmente vem de rios que, por serem localizados próximos ao oceano, sofrem com a intrusão das marés que em determinadas épocas do ano aumenta a salinidade das águas usadas na irrigação (GREGORIO *et al.*, 2002). Como consequências a salinidade em excesso dificulta a extração de água do solo por meio das raízes, interfere no crescimento e metabolismo celular, pode inibir germinação de sementes, crescimento de plântulas e florescimento, e fixação dos frutos (MUNNS; TESTER, 2008). As plantas sensíveis a salinidade são chamadas de glicófitas e incluem arroz (*Oryza sativa*), milho (*Zea mays*), soja (*Glycine max*) e feijão (*Phaseolus vulgaris*) (MAHAJAN *et al.*, 2005).

O crescimento das plantas na agricultura é bastante influenciado por fatores bióticos e abióticos, influência essa que grande parte das vezes é combatida com o uso de agrotóxicos e fertilizantes químicos. Pela elevada concentração de compostos químicos, estes produtos estão sendo apontados como um grave problema para o ambiente e para a saúde humana contaminando águas, solos e o ar, além de causar intoxicações (BEDOR *et al.*, 2009). Segundo dados divulgados pelo INCA (Instituto Nacional de Câncer), o Brasil é o maior consumidor mundial de agrotóxicos, com consumo anual médio de 5,2 Kg de agrotóxico por habitante, totalizando um total de um milhão de toneladas utilizadas por ano (INCA, 2015). Uma maneira mais sustentável de diminuir o dano causado as plantas por esses fatores e não poluir e causar intoxicações é o uso de biofertilizantes feitos a partir dos micro-organismo promotores do crescimento de plantas.

Dentre os micro-organismos promotores do crescimento de plantas alguns já são utilizados na composição de biofertilizantes. Dentre eles podemos citar bactérias do gênero *Rhizobium* que formam nódulos nas raízes de plantas da família Fabaceae, onde fazem fixação de nitrogênio (MASSON-BOIVIN *et al.*, 2009), micro-organismos como *Trichoderma harzianum* que aumentam a disponibilidade de nutrientes no solo (KHAN *et al.*, 2017), a bactéria *Bacillus cereus* que induz aumento na área da superfície da raiz (VESSEY; BUSS, 2002), e *Pseudomonas diminuta* que aumenta outras simbioses benéficas ao hospedeiro (“helper bacteria”)

(RANE *et al.*, 2004). O biofertilizante ainda pode ser uma combinação de vários micro-organismos com propriedades diferentes (VESSEY, 2003).

As leveduras são fungos unicelulares pertencentes em sua maioria ao filo Ascomycota, com alguns representantes em Basidiomycota (BOTHÁ, 2011; MADIGAN *et al.*, 2012), que possuem grande importância na produção de etanol, fermentação em bebidas alcoólicas, e na produção de fermento para pães. Leveduras são abundantes no solo, rizosfera e nas folhas de diversas plantas. Alguns estudos demonstram que as leveduras produzem muitos compostos bioativos importantes para as plantas, tais como fitohormônios, aminoácidos, enzimas e vitaminas (MUKHERJEE; SEN, 2015). Por esses motivos algumas também são promotoras do crescimento de plantas e têm sido bastante estudadas para o uso no biocontrole de doenças pós-colheita em frutos e vegetais (WILSON; WISNIEWSKI, 1989) e no combate a doenças foliares (LEE *et al.*, 2017). As leveduras são ótimas como agentes de biocontrole pois são o principal componente da comunidade microbiana epifítica na superfície de folhas, frutas e vegetais, sendo fenotipicamente adaptadas a esses nichos, capazes de colonizá-los e competir efetivamente por nutrientes e espaço em sua superfície (EL-TARABILY, 2004). As leveduras também podem colonizar o solo e as raízes das plantas, como *Candida tropicalis* HY que coloniza o solo e já se demonstrou efetiva na promoção do crescimento de arroz (AMPRAYN *et al.*, 2012). Outro exemplo é *Cryptococcus* sp. NSE1 que já se mostrou tolerante a metais pesados protegendo a planta *Sedum plumbizincicola* contra a toxicidade do cádmio (LIU *et al.*, 2016).

Visto os benefícios do uso das leveduras como um micro-organismo promotor do crescimento de plantas e a importância do uso destes na agricultura, acredita-se que as leveduras podem promover o crescimento de plantas, aumentando assim a sua resistência contra várias situações de estresse.

O presente estudo caracterizou leveduras isoladas de diferentes locais que possuam habilidades promotoras do crescimento de plantas.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

Esse trabalho teve como objetivo principal avaliar o desempenho de leveduras selecionadas no crescimento de plantas de feijão em co-inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio, e de arroz e de tomate em condições de estresse salino e hídrico.

1.2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar bioquimicamente leveduras isoladas de solo e plantas;
- Avaliar a capacidade das leveduras em promover o crescimento de plantas de feijão, arroz e de tomate.

2- Material e métodos

2.1 Coleta e isolamento das leveduras

As leveduras utilizadas neste estudo foram previamente coletadas de diversos ambientes diferentes (solo, plantas) e isoladas em meio mínimo DF suplementado com 5 mM ACC (única fonte de nitrogênio) (Nascimento, resultados não publicados). As leveduras (n=14) foram mantidas e repicadas em placas de Petri com meio de cultivo para crescimento de leveduras YPDA (10 g/L extrato de levedura, 20 g/L peptona, 20 g/L Dextrose, e 15 g/L Agar).

2.2 Caracterização bioquímica

Após o isolamento as leveduras obtidas passaram por diversos testes com o objetivo de avaliar suas características promotoras do crescimento de plantas. Foram realizados os seguintes testes: produção de ácido indolacético (AIA), solubilização de fosfato, produção de sideróforos, produção de lipase, produção de protease, e produção de celulase.

2.2.1 Produção de AIA

A avaliação da produção de AIA foi realizada em meio de cultura YPDB (10 g/L Extrato de levedura, 20 g/L Peptona, 20 g/L Dextrose) contendo triptofano (500 µg/mL). Em um tubo para centrífuga foram colocados 5 mL de YPDB + triptofano, e 5 µL de levedura previamente crescida em meio YPDB. Os tubos foram incubados por 7 dias a 28°C com agitação. Para avaliação dos resultados foi colocado 1 mL da levedura crescida no meio YPDB + triptofano em microtubo para centrífuga. Esse microtubo foi centrifugado por 2 min em 13400 RPM. Após a centrifugação retirou-se 1 mL do sobrenadante para uma cubeta e posteriormente foi adicionado 2 mL de reagente de Salkowski (2 mL FeCl₃ 0,5 M, 49 mL água, 49 mL ácido perclórico 70%) e deixado descansar por 30 minutos. O aparecimento de cor rosada indica a produção de AIA.

2.2.2 Produção de sideróforos

A capacidade de produção de sideróforos foi avaliada utilizando-se o método descrito por Schwyn e Neilands (1987). A fonte de ferro

desse método vem de um complexo com o corante Cromo Azurol S (CAS). A produção de sideróforos é indicada por uma mudança de cor no meio de cultura, de azul para alaranjado.

2.2.3 Solubilização de Fosfato

Para a avaliação da solubilização de fosfato foi utilizado o meio de cultura PDA com extrato de levedura (39 g/L Potato Dextrose Agar, 5 g/L extrato de levedura, 6 g/L Agar, 50 mL/L de solução 10% de HPO_4 e 100 mL/L de solução 10% de CaCl_2 , previamente esterilizadas por filtração). As leveduras que realizaram a solubilização de fosfato apresentam um halo em volta de suas colônias.

2.2.4 Produção de Lipase

Para a avaliação da produção de lipase as leveduras foram repicadas em placas de Petri com meio para detecção de produção de lipase (8 g/L nutrient broth, 4 g/L NaCl, 10 g/L Agar, 31,25 mL/L azeite de oliva, 10 mL/L Rodamina B (1 mg/mL)). Para a avaliação do resultado as placas são colocadas em luz UV, nas placas com resultado positivo as leveduras se apresentam com um halo alaranjado.

2.2.5 Produção de Protease

Para a avaliação da produção de protease as leveduras foram repicadas em placas de Petri com meio para avaliação da produção de protease (5 g/L peptona, 5 g/L NaCl, 1,5 g/L extrato de carne, 1,5 g/L extrato de levedura, 15 g/L Agar, 100 mL/L leite desnatado sem lactose). Após crescimento, as leveduras que apresentarem um halo em volta de suas colônias apresentam produção de protease.

2.2.6 Produção de Celulase

Para a avaliação da produção de celulase as leveduras foram repicadas em placas de Petri com meio CMC (2 g/L NaNO_3 , 1 g/L KH_2PO_4 , 0,5 g/L MgSO_4 , 0,5 g/L KCl, 2 g/L celulose CMC, 2 g/L Peptona, 17 g/L Agar). Uma solução de iodo (solução Gram II) foi utilizada como revelador de atividade de celulase. A atividade de celulase é considerada positiva se um halo de transparência surgir em volta das colônias de levedura após a aplicação da solução de iodo.

Após realizados todos os testes da caracterização bioquímica, algumas leveduras foram selecionadas para serem usadas nos ensaios em plantas.

2.4. Ensaios de promoção de crescimento de plantas

Após a realização da caracterização bioquímica, as leveduras selecionadas foram testadas em plantas a fim de selecionar as cepas com características de promoção de crescimento vegetal.

2.4.1 Preparo do inoculante

Para o preparo do inoculante as leveduras foram crescidas em meio líquido YPDB. Após o crescimento, 30 mL da cultura foram centrifugadas a 6000 rpm por 4 minutos, o sobrenadante descartado e foi adicionado 30 mL de sulfato de magnésio ($MgSO_4$) ao precipitado. A densidade óptica (OD) da solução foi medida em fotocolorímetro após agitação para dissolver o precipitado. Após a medição a solução foi diluída com $MgSO_4$ até que se alcançasse uma OD = 0,5. O inoculante referente ao tratamento foi aplicado a planta.

2.4.2 Efeito das leveduras na nodulação por rizóbio

A fim de se estudar o efeito de leveduras como adjuvantes no processo de nodulação por rizóbio foi realizado um ensaio utilizando o sistema modelo feijão-rizóbio. Nesse ensaio utilizou-se o feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*). Sete tratamentos diferentes foram montados para esse ensaio: Controle Positivo, onde as plantas receberam apenas solução de nitrogênio; Controle Negativo, onde as plantas não receberam nenhum tipo de solução ou inoculante; Rizóbio, onde as plantas receberam inoculante da bactéria *Rhizobium tropici* 899; TL1, onde as plantas receberam inoculante da levedura chamada de TL1 e inoculante da bactéria *Rhizobium tropici* 899; TL3, onde as plantas receberam inoculante da levedura TL3 e inoculante da bactéria *Rhizobium tropici* 899; ALCS3, onde as plantas receberam inoculante da levedura ALCS3 e inoculante da bactéria *Rhizobium tropici* 899; e APM2D, onde as plantas receberam inoculante da levedura APM2D e inoculante da bactéria *Rhizobium tropici* 899. Todos os tratamentos continham dez plantas. As sementes selecionadas passaram por um processo de desinfecção superficial sendo submergidas, primeiramente, em etanol (EtOH) 70% durante 60 segundos e, após, em hipoclorito de sódio

(NaClO) 2% durante 5 minutos. Para a germinação, as sementes previamente selecionadas e desinfetadas foram germinadas no escuro a 25 °C em recipiente com vermiculita previamente esterilizada. Após a germinação, as sementes germinadas foram depositadas em tubetes para mudas com vermiculita/areia (2:1) esterilizados e receberam 1 mL de inoculante produzido com as leveduras crescidas em meio YPDB e/ou 1 mL de inoculante produzido com a bactéria *Rhizobium tropici* 899 como especificado nos tratamentos acima ou a mesma quantidade de solução de MgSO₄. Todos os tratamentos foram mantidos por 15 dias em casa de vegetação. Durante os 7 primeiros dias as plantas foram regadas com água destilada quando necessário e, após, a rega com água destilada começou a ser alternada com rega com solução nutritiva de B&D (BROUGHTON; DILWORTH, 1971).

Após o período de 15 dias, o número de nódulos formados nas raízes foi contado, caule e raiz foram separados, embalados em papel alumínio e secos em estufa a 60 °C até apresentarem peso constante. Após, os caules e raízes foram pesados separadamente em balança analítica de precisão e os pesos e números de nódulos foram avaliados e comparados com os tratamentos controle.

2.4.3 Ensaio em plantas com presença de estresse abiótico

Foi avaliado o desempenho das leveduras na promoção do crescimento de plantas submetidas a dois diferentes estresses abióticos. No primeiro ensaio utilizou-se arroz (*Oryza sativa*) em presença de estresse salino durante o desenvolvimento da planta. E no segundo, tomate (*Solanum lycopersicum*) em presença de estresse hídrico durante o desenvolvimento da planta.

2.4.3.1 - Arroz e estresse salino

Para o ensaio de estresse salino utilizou-se os seguintes tratamentos: controle, TL1, TL3, APM2D a ALCS3. Em todos os tratamentos sete plantas receberam estresse salino durante o decorrer do ensaio e outras sete não receberam. As sementes de arroz selecionadas, cedidas pela Epagri, Araranguá-SC passaram por uma desinfecção superficial de 30 segundos em etanol (EtOH) 70%, 60 segundos em hipoclorito de sódio (NaClO) 2% e 4 lavagens em água destilada para remoção de resíduos. Após esses procedimentos, as sementes passaram por uma pré-germinação: foram submergidas em água destilada e mantidas dessa forma por 48h em estufa para germinação de sementes a

~25 °C. Após, para a germinação, foram incubadas no escuro a 25 °C em placas de Petri com meio ágar 1% durante 4 dias. Em seguida, as sementes foram transferidas para copos plásticos de 300 mL com vermiculita/areia (2:1) esterilizados e foram inoculadas com 1mL de inoculante da levedura de seu tratamento. O ensaio foi mantido por 60 dias em casa de vegetação. Durante os 7 primeiros dias as plantas foram regadas, quando necessário, com água destilada, após esse período as plantas passaram a ser regadas 3 vezes por semana com solução de Hoagland (HOAGLAND; ARNON, 1950). As plantas dos tratamentos submetidos ao estresse recebiam solução de Hoagland + solução de NaCl 100 mM/L, quantidade essa que já se mostrou prejudicial em plantas de arroz, prejudicando o crescimento das raízes e diminuindo pesos fresco e seco da planta (MA *et al.*, 2016). As plantas foram submetidas a estresse salino durante 7 semanas. No decorrer do ensaio mostrou-se necessária suplementação de nitrogênio nas plantas. Utilizou-se 80 Kg N/ha de acordo com o volume de substrato presente nos copos plásticos. O nitrogênio foi aplicado em todos os tratamentos diluído na solução nutritiva.

Após o período do ensaio, caule e raiz foram separados, colocados em sacos de papel e mantidos em estufa a 60 °C apresentarem peso constante. As raízes e os caules secos foram pesados em balança de precisão analítica e os resultados dos grupos com e sem estresse foram comparados.

2.4.3.2 Tomate e estresse hídrico

O ensaio com estresse hídrico teve os mesmos tratamentos e quantidades de plantas do ensaio com estresse salino, com diferença do estresse aplicado nos ensaios. As sementes de tomate selecionadas passaram por desinfecção superficial como feito com as sementes do ensaio com estresse salino. Posteriormente a esse procedimento, as sementes foram semeadas em copos plásticos de 300 mL com vermiculita/areia (2:1) esterilizados. Na semeadura foram colocadas 3 sementes por copo, após a germinação inicial as plantas crescidas a mais foram descartadas restando apenas uma planta por copo. Após 13 dias da semeadura as plantas foram inoculadas com 1mL de inoculante da levedura de seu tratamento. O ensaio foi mantido ao todo por 51 dias em casa de vegetação. Durante os primeiros 14 dias a plantas foram regadas com água destilada quando necessário, após, as plantas começaram a ser regadas três vezes por semana com solução nutritiva de Hoagland, durante a última semana as plantas de cada tratamento submetidas a estresse hídrico não receberam nenhum tipo de rega.

Após o referido tempo, caule e raiz foram separados, colocados em sacos de papel e mantidos em estufa a 60 °C até se apresentarem peso constante. Após esse período caules e raízes foram pesados em balança analítica de precisão e os pesos das plantas dos tratamentos com e sem estresse foram analisados.

2.5 Análise estatística

As análises estatísticas desse trabalho foram realizadas com o auxílio do software Sisvar. Foi realizada análise de variância (ANOVA) com teste de Tukey. Para a análise do número de nódulos presentes nas raízes das plantas de *P. vulgaris* fez-se necessário a transformação dos dados utilizando a fórmula:

$$\sqrt{x + 0,5}.$$

3- Resultados

3.1 Isolamento das leveduras

Um total de 14 leveduras foram isoladas para a realização deste estudo. As leveduras testadas foram coletadas em diferentes ambientes. Dentre elas, a levedura TL1 e TL3 foram coletadas na folha de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). A levedura APM2D foi coletada em um lago localizado na Vargem Pequena, Florianópolis, SC, e a levedura ALCS3 foi coletada em solo contaminado com alumínio em Portugal.

3.2 Caracterização bioquímica

A tabela 1 mostra os resultados dos testes bioquímicos realizados com as 14 leveduras isoladas.

Nenhuma das leveduras testadas apresentou produção de Ácido indolacético (AIA). No teste de produção de sideróforos nenhuma das leveduras apresentou resultados positivos. Houve crescimento, mas sem aparente produção de sideróforos pelas leveduras TL3, TL1, APM2G, PM3 PM1 e ALCS3. Nos testes de solubilização de fosfato apenas as leveduras CLL1, CLL2 e CLL3 apresentaram resultados positivos. Quanto a produção de lipase as leveduras PM3, MAC1 e ALCS3 apresentaram-se laranjas e com halo na luz UV indicando alta produção de lipase. AS leveduras PM1, TL1, APM2P, APM2G, CLL2 e CLL3

apresentaram-se laranjas sob luz UV indicando produção de lipase, apesar de baixa. Já as leveduras TL3, YSF1, YSF2, APM2D e CLL1 não se apresentaram laranjas, nem apresentaram halo em volta das colônias sob luz UV indicando que não produziram lipases. Nenhuma das leveduras estudadas demonstrou resultado positivos no teste de produção de protease. No teste de produção de celulase as leveduras PM1, PM3, ALCS3, YSF1, YSF3, CLL1, CLL2 e CLL3 apresentaram alta produção. A levedura TL3 apresentou produção de celulase, porém em menor quantidade que as outras leveduras. As leveduras MAC1, TL1, APM2D, APM2P e APM2G não apresentaram produção de celulase.

A partir desses resultados, 4 leveduras foram selecionadas para a identificação molecular e os ensaios de promoção de crescimento de plantas. As selecionadas foram TL1, TL3, ALCS3 e APM2D.

Tabela 1 - Resultados dos testes bioquímicos realizados nas leveduras, onde ++ significa resultados positivos, + resultados positivos com baixa atividade, - resultados negativos e / apenas crescimento da levedura na placa de Petri sem aparente produção da substância referida. As leveduras com código em vermelho foram selecionadas para os próximos testes.

Levedura	AIA	SIDERÓFOROS	Sol. DE FOSFATO	LIPASE	PROTEASE	CELULASE
PM1	-	/	-	+	-	++
PM3	-	/	-	++	-	++
MAC1	-	-	-	++	-	-
ALCS3	-	/	-	++	-	++
TL1	-	/	-	+	-	-
TL3	-	/	-	-	-	+
YSF1	-	-	-	-	-	++
YSF2	-	-	-	-	-	++
APM2D	-	-	-	-	-	-
APM2P	-	-	-	+	-	-
APM2G	-	/	-	+	-	-
CLL1	-	-	++	-	-	++
CLL2	-	-	++	+	-	++
CLL3	-	-	++	+	-	++

3.2 Identificação

As cepas selecionadas passaram anteriormente por processo de identificação via região ITS, sendo caracterizadas como: *Issatchenkia orientalis* (TL1), *Candida intermedia* (TL3), *Saturnispora diversa* (APM2D), e *Sarocladium kiliense* (ALCS3).

3.3 Ensaios de promoção de crescimento de plantas

3.3.1 Efeito das leveduras na nodulação por rizóbio

Em relação ao peso seco dos caules o tratamento que apresentou maior média foi o controle positivo. Apesar de maior o valor diferiu somente do peso do tratamento com TL3, cujo valor também não diferiu dos valores obtidos nos outros tratamentos (figura 1).

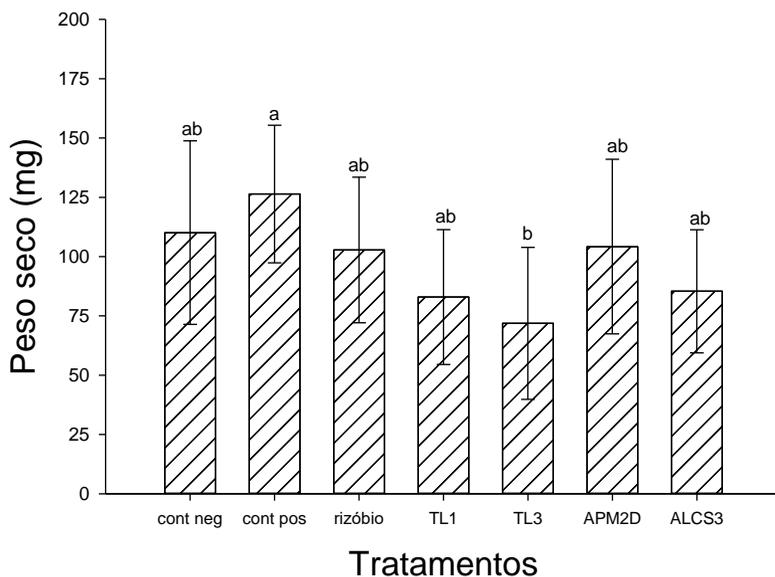


Figura 1 - Pesos médios dos caules de dez plantas de feijão, letras diferentes correspondem a valores significativamente diferentes entre os tratamentos.

Quanto ao peso seco médio da raiz, os tratamentos não diferiram entre si (figura 2).

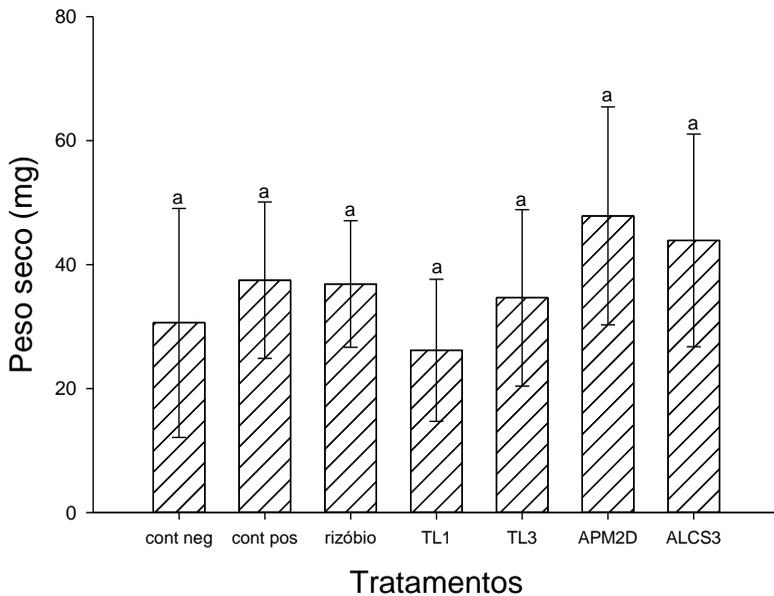


Figura 2 - Pesos médios das raízes de dez plantas de feijão, letras diferentes correspondem a valores significativamente diferentes.

Quanto a quantidade média de nódulos formados nas raízes, o tratamento que apresentou a maior média de nódulos foi o tratamento das plantas que receberam apenas a bactéria. Os valores dos outros tratamentos não diferiram entre si (figura 3).

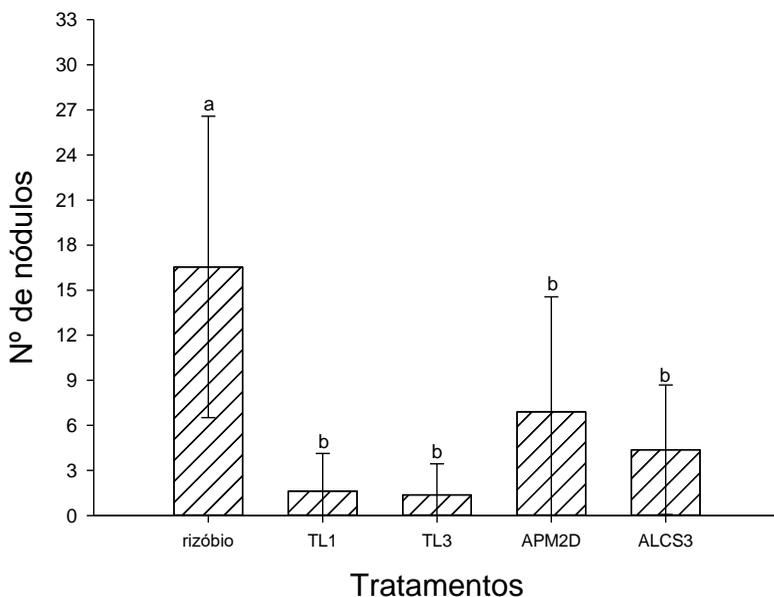


Figura 3 - Número médio de nódulos presentes nas raízes de dez plantas de feijão, letras diferentes correspondem valores significativamente diferentes.

Apesar das diferenças não serem significativas, dentre as 4 leveduras a que atingiu melhor desempenho no peso seco das plantas foi APM2D, apesar de não ter apresentado maior número de nódulos que o tratamento Rizóbio

3.3.2 Ensaio em plantas com presença de estresse abiótico

3.3.2.1 Arroz e estresse salino

As figuras 4 e 5 mostram comparações dos tamanhos com duas plantas de cada tratamento realizado: a maior planta entre as que cresceram sem presença de estresse e a maior entre as que cresceram em presença de estresse.



Figura 4 - Comparação entre os tamanhos de raiz e caule das plantas do tratamento controle, e aquelas inoculadas com *I. orientalis* e *C. intermedia*.



Figura 5 - Comparação entre os tamanhos de raiz e caule das plantas do tratamento controle, e aquelas inoculadas com *S. kiliense* e *S. diversa*.

Quanto ao peso seco da raiz, todos os tratamentos mostraram diferença entre os pesos nas plantas sem estresse e com estresse, sendo que em todos os tratamentos o peso seco médio das plantas sem estresse foi maior (figura 6). Dentre as leveduras, TL1 atingiu o maior peso seco médio de raiz, não diferenciando de TL3 e APM2D. O tratamento controle obteve o menor peso seco médio de raiz, não diferenciando significativamente de APM2D.

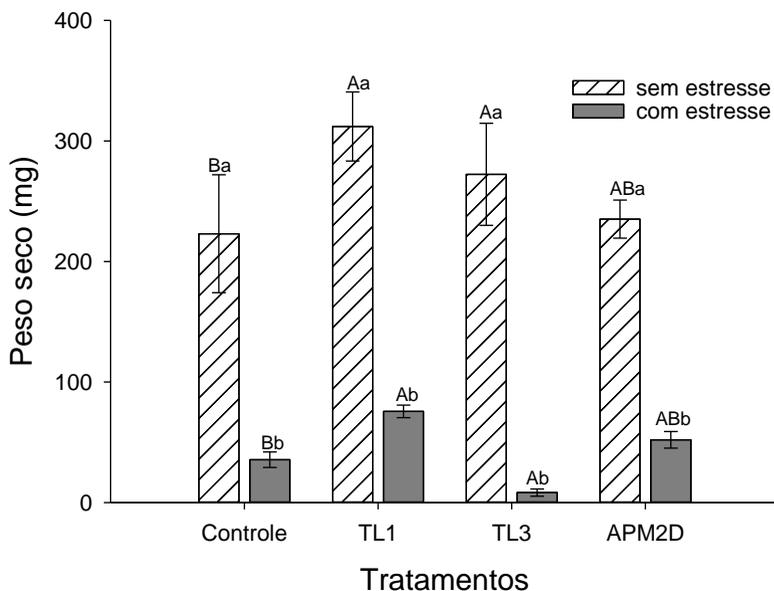


Figura 6 - Pesos secos médios da raiz de sete plantas de arroz crescidas em condições normais e sete plantas crescidas em presença de estresse salino para cada tratamento. Letras minúsculas diferentes entre os estresses do mesmo tratamento indicam valores significativamente diferentes. Letras maiúsculas diferentes entre os tratamentos indicam valores significativamente diferentes entre os tratamentos como um todo.

O peso seco médio do caule foi avaliado, mas não foi obtida nenhuma diferença significativa entre os tratamentos (figura 7).

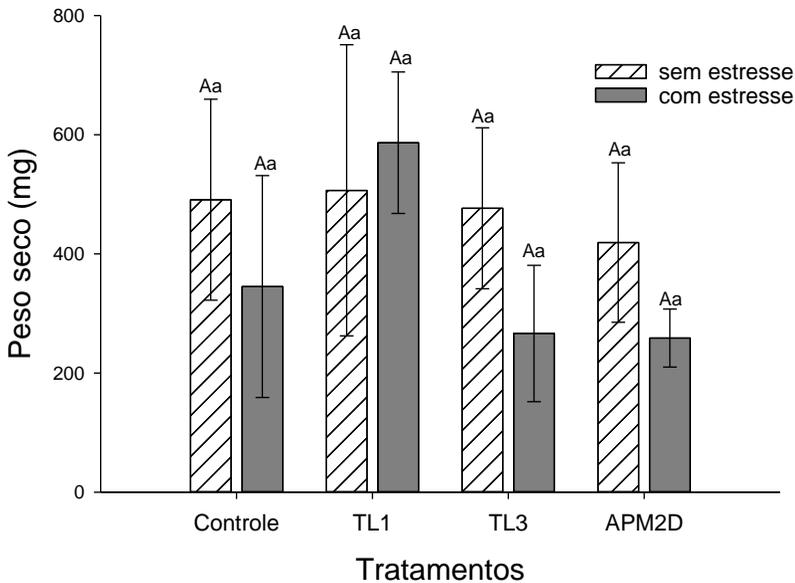


Figura 7 - Peso seco médio dos caules de sete plantas de arroz crescidas em condições normais e sete plantas crescidas em presença de estresse salino para cada tratamento. Letras minúsculas diferentes indicam valores diferentes entre os estresses de cada tratamento e letras maiúsculas diferentes indicam valores diferentes entre cada tratamento.

Por motivos de contaminação comum fungo o tratamento com ALCS3 passou apenas 37 dias na casa de vegetação e, dessa forma, não será analisado.

3.3.2.2 Tomate e estresse hídrico

As figuras 8 e 9 mostram comparações dos tamanhos com duas plantas de cada tratamento realizado: a maior planta entre as que cresceram sem presença de estresse e a maior entre as que cresceram em presença de estresse.

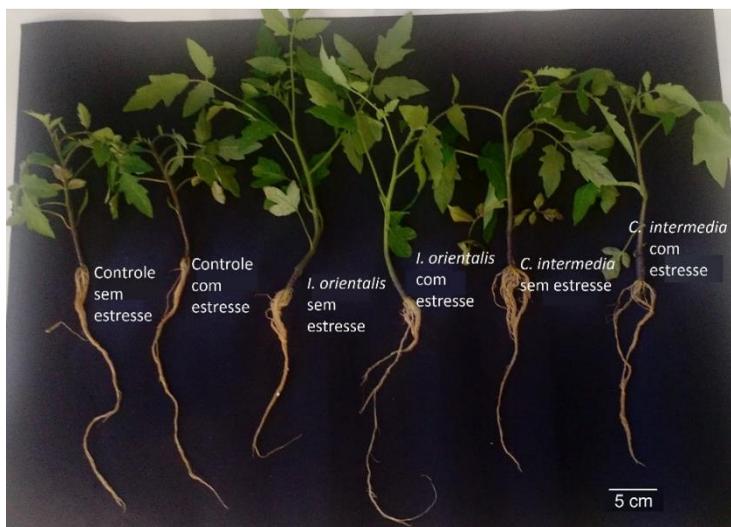


Figura 8 - Comparação entre os tamanhos de raiz e caule das plantas do tratamento controle, e aquelas inoculadas com *I. orientalis* e *C. intermedia*.

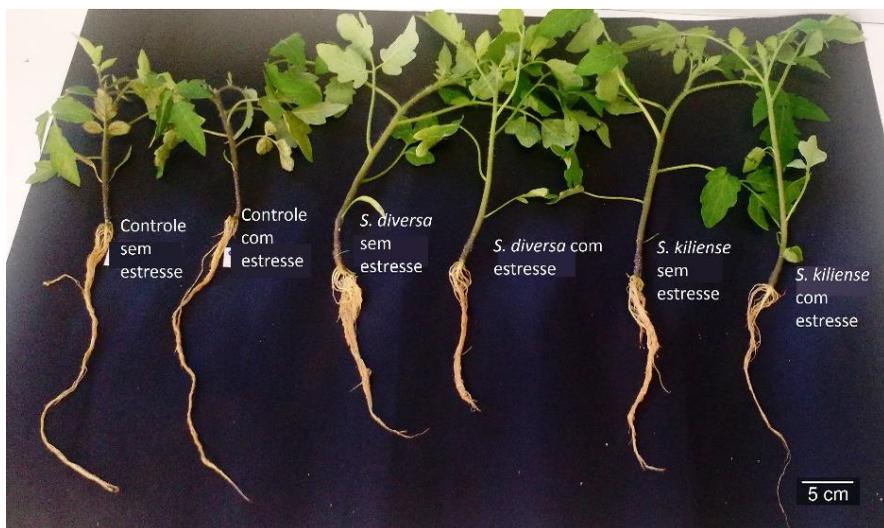


Figura 9 - Comparação entre os tamanhos de raiz e caule das plantas do tratamento controle, e aquelas inoculadas com *S. diversa* e *S. kiliense*.

As plantas do tratamento com ALCS3 apresentaram maior crescimento médio de raiz na comparação entre tratamentos e na comparação entre as plantas com estresse de todos os tratamentos. O tratamento *S. kiliense* também foi o único que apresentou diferenças entre as plantas sem estresse e com estresse (figura 10).

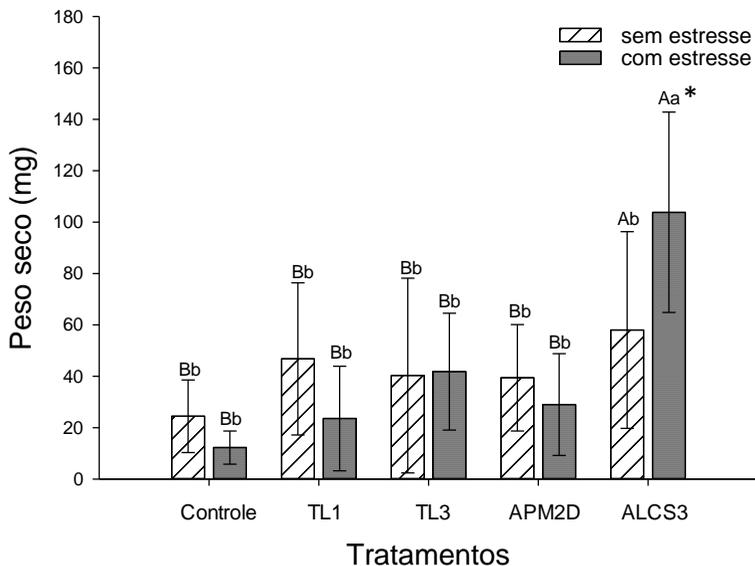


Figura 10 - Médias de pesos secos de raiz de sete plantas de tomate crescidas em condições normais e sete plantas crescidas em presença de estresse hídrico para cada tratamento. Letras maiúsculas diferentes representam valores estatisticamente diferentes entre os tratamentos. Letras minúsculas diferentes representam valores estatisticamente diferentes entre os estresses do mesmo tratamento. * representa o único tratamento com estresse que apresentou média significativamente diferente das demais.

Nas médias de peso seco de caule entre os tratamentos sem estresse o tratamento controle obteve a média de peso mais baixa, igual a média do tratamento com TL3. A média do tratamento TL3 também foi igual aos demais tratamentos. Entre os tratamentos com estresse a única média diferente, e também a mais baixa, foi a do tratamento controle. Entre os tratamentos com estresse somente ALCS3 apresentou diferença entre os estresses (figura 11).

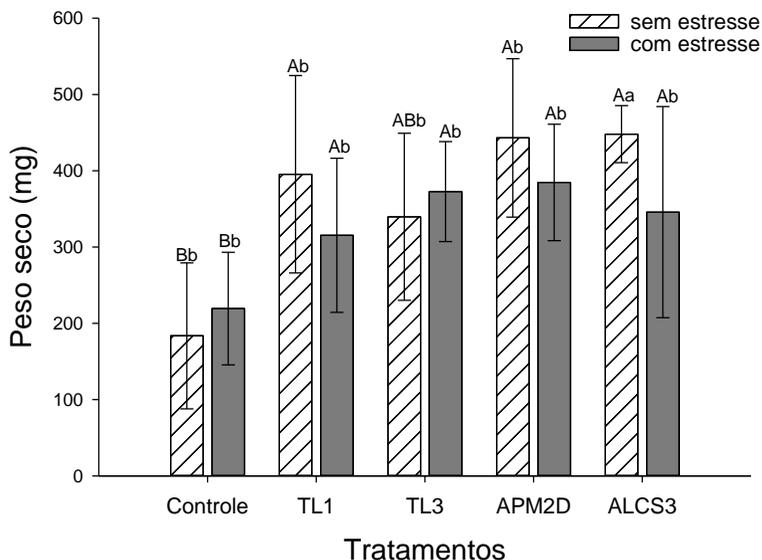


Figura 11 - Médias de pesos secos de caule de sete plantas de tomate crescidas em condições normais e sete plantas crescidas em presença de estresse hídrico para cada tratamento. Letras maiúsculas diferentes representam valores estatisticamente diferentes entre os estresses entre os tratamentos. Letras minúsculas diferentes representam valores estatisticamente diferentes entre os estresses do mesmo tratamento.

4- Discussão

4.1 Caracterização bioquímica

Na caracterização bioquímica a levedura TL1 (*Issatchenkia orientalis*) apresentou apenas capacidade de produção de lipases corroborando resultados de Costas, Deive e Longo (2004) e You e colaboradores (2016). You e colaboradores (2016) também verificaram cepas de *I. orientalis* que não produziam celulases e proteases.

Em TL3 (*Candida intermedia*) foi observada apenas a capacidade de produção de celulases. Nenhum trabalho foi encontrado na literatura que apresentasse esse mesmo resultado. Neves e colaboradores (2006) já registraram produção de proteases em uma cepa de *C. intermedia*.

APM2D (*Saturnispora diversa*) não apresentou nenhum resultado positivo na caracterização bioquímica efetuada no presente trabalho.

Jaiboon e colaboradores (2016) relataram produção de AIA e lipase para uma cepa dessa levedura.

ALCS3 (*Sarocladium kiliense*) apresentou produção de lipases e celulases. A produção de celulases corrobora resultados de Tarayre e colaboradores (2015). Entretanto, não foram encontrados resultados semelhantes quanto a produção de lipases por cepas de *S. kiliense*. Um estudo já relatou a capacidade de *S. kiliense* de agir no biocontrole de infecções por *Fusarium graminearum* em trigo (COMBY *et al.*, 2017).

Esses resultados demonstram que a capacidade das leveduras selecionadas em contribuir com o crescimento e desenvolvimento das plantas testadas é diversa. A habilidade de produzir enzimas como celulases, proteases e lipases dá ao micro-organismo a capacidade de explorar melhor o substrato orgânico disponível, permitindo aumento no desenvolvimento e melhora as interações benéficas com plantas. Compostos melhor degradados provêm, comumente, melhorias na solubilização de elementos químicos que por sua vez podem ser disponibilizados para as plantas. Com uma melhor condição nutricional, as plantas obtêm um maior crescimento de raízes, parte aérea, maior resistência a infecção por patógenos, melhor desempenho frente a estresses, como o estresse hídrico e salino, objeto do presente estudo. Assim, um micro-organismo promotor do crescimento de plantas que apresenta esses resultados nessa e outras avaliações realizadas permite maiores rendimentos das culturas, com interações mais duradouras e efetivas com a microbiota do solo, da rizosfera, e aquela endofiticamente associada a essas espécies vegetais. A escolha de um micro-organismo sem resultados positivos nessa caracterização bioquímica é justificada pelo fato de resultados positivos nesses testes, apesar de importantes, não são elementos imprescindíveis para o desempenho efetivo de um micro-organismo como promotor do crescimento de plantas uma vez que todas as leveduras estudadas parecem produzir ACC desaminase, considerado elemento chave para a promoção do crescimento de plantas (GLICK, 2014).

O substrato e a casa de vegetação utilizados são fatores que podem ter contribuído para desempenho das leveduras utilizadas como promotoras do crescimento nos ensaios. A utilização de vermiculita + areia e a aplicação de nutrientes somente na forma de soluções nutritivas limita a solubilização dos nutrientes por parte dos micro-organismos. A solubilização seria melhor observada com o uso de solo como substrato nos ensaios. As condições da casa de vegetação utilizada também interferem nos resultados dos ensaios, visto que a casa não possui um sistema de controle adequado de temperatura e umidade.

4.2 Ensaio de nodulação

No ensaio de nodulação, o tratamento com TL3 apresentou a média de peso seco mais baixa dentre os tratamentos realizados, apesar de diferir somente do tratamento controle positivo. Quanto às médias de crescimento das raízes, nenhum dos tratamentos apresentou diferença significativa de crescimento. Em relação à formação de nódulos, o tratamento Rizóbio apresentou a média mais alta, a única estatisticamente diferente das demais. Dessa forma, conclui-se que as leveduras utilizadas não apresentaram resultados positivos como promotoras do crescimento de plantas e potencializadoras da nodulação em feijão. O curto tempo de duração do ensaio não é considerado como fator de interferência no número de nódulos formados, visto que nódulos já haviam se formado na maioria das raízes. No entanto, é sabido que um micro-organismo promotor do crescimento de plantas que produz somente ACC desaminase, e não produz AIA, poderia potencializar a nodulação em legumes apenas aumentando a longevidade dos nódulos. Dessa forma, o curto período de duração do ensaio pode ser considerado um fator para os resultados (GONTIA-MISHRA; SASIDHARAN; TIWARI, 2014; MOLLER *et al.*, 2016).

Apesar da falta de resultados positivos com o uso das leveduras estudadas, vários estudos já mostraram aumento da formação de nódulos em legumes após a inoculação de micro-organismos promotores do crescimento de plantas (FIGUEIREDO *et al.*, 2008; SHAHAROONA; ARSHAD; ZAHIR, 2006; SINGH; KAPOOR; WANGE, 1991).

O uso de poucas plantas por tratamento é considerado fator contribuinte para o grande erro amostral apresentado nas médias desse ensaio. A utilização de uma maior quantidade de amostras por tratamento teria baixado os erros amostrais tornando mais fácil a visualização e discussão dos resultados.

4.3 Arroz e estresse salino

Estudos já publicados mostram que a salinidade em excesso é prejudicial para o crescimento de plantas de arroz (ASCH; WOPEREIS, 2001; FORNI; DUCA; GLICK, 2016). Nesse ensaio as plantas expostas ao estresse não apresentaram diferenças de peso seco de caule em comparação às plantas não expostas ao estresse em nenhum dos tratamentos. Entretanto, as médias de peso seco de raiz entre plantas expostas ou não expostas ao estresse salino diferiram em todos os

tratamentos. Os resultados do presente trabalho para o peso seco de raiz corroboram a afirmação de Asch e Wopereis (2001) e Forni, Duca e Glick (2016).

A literatura sobre o tema demonstra que o excesso de sal induz a senescência foliar em plantas de arroz (LUTTS; KINET; BOUHARMONT, 1996). Os resultados do presente ensaio corroboram essa afirmação, visto que em algumas plantas foi observado o envelhecimento das folhas logo antes da morte das plantas. Contudo, a mortalidade foi alta também em plantas não expostas ao estresse salino. Esses resultados podem ter sido influenciados pela época da semeadura, visto que no Brasil o plantio comercial é realizado entre novembro e fevereiro, período com maior disponibilidade de radiação solar e temperatura (MARCHESAN *et al.*, 2007). Para esse trabalho o ensaio foi realizado durante os meses de março e maio. Problemas na forma de germinação utilizada inicialmente acarretaram na montagem de um ensaio somente quando a planta já não estava mais em sua época de plantio. A utilização de uma planta apropriada para a época teria evitado a alta ocorrência de mortalidade.

Ainda no que se refere ao ensaio com salinidade, desconsiderando a exposição ao estresse, o crescimento de raiz das plantas dos tratamentos TL1 e TL3 apresentaram crescimento maior que as plantas do tratamento controle. Entretanto, as médias de crescimento das plantas do tratamento expostas ao estresse não apresentaram diferenças. Dessa forma, o potencial promotor de crescimento de plantas em exposição ao estresse salino de TL1 e TL3 precisa ser melhor avaliado.

O uso de poucas plantas por tratamento, e a divisão dessas entre plantas que passaram ou não por exposição ao estresse abiótico, é considerado fator contribuinte para o grande erro amostral apresentado nas médias desse ensaio. A utilização de uma maior quantidade de amostras por tratamento teria baixado os erros amostrais tornando mais fácil a visualização e discussão dos resultados.

Outros estudos já observaram potencialização do crescimento de arroz em estresse salino com o uso de micro-organismos promotores do crescimento de plantas (JHA; SUBRAMANIAN; PATEL, 2011; SHAHZAD *et al.*, 2017). Bal e colaboradores (2013) observaram diminuição na produção de etileno realizada pela planta e conseqüente melhora no crescimento de plantas de arroz, efeitos esses atribuídos a produção de ACC-desaminase por parte da bactéria inoculada. No presente estudo medições dos níveis de etileno produzidos pelas plantas não foram realizadas e não houveram resultados de amenização dos danos

causados pela salinidade nas plantas inoculadas com levedura. Porém, se os resultados obtidos fossem positivos poderíamos inferir o mesmo, visto que as leveduras estudadas parecem produzir ACC-desaminase. Danos ocasionais causados por micro-organismos promotores do crescimento de plantas a plantas sob estresse abiótico também já foram registrados na literatura. Nakbanpote e colaboradores (2014) observaram diminuição na germinação, comprimento de raiz e caule, e pesos fresco e seco em arroz cultivado sob estresse salino e com inoculação de *Pseudomonas* sp. No mesmo estudo a cepa utilizada mostrou-se tolerante a salinidade. Os autores atribuíram os resultados negativos a elevada produção de AIA e a patogenicidade da bactéria a arrozeiros. No presente estudo, o índice de mortalidade das plantas de arroz não pode ser atribuído a produção elevada de AIA por parte das leveduras, visto que as leveduras estudadas não produzem AIA. E, como já citado anteriormente, a mortalidade atingiu plantas de todos os tratamentos.

4.4 Tomate e estresse hídrico

Em plantas expostas ao estresse hídrico o tamanho das folhas é reduzido para que haja diminuição na transpiração e, conseqüentemente, na perda de água (MAHAJAN *et al.*, 2005). No presente ensaio, era esperado que apenas o tratamento controle apresentasse diferença entre as médias de crescimento das plantas expostas e não expostas ao estresse hídrico. O fato do tratamento não ter apresentado essa diferença pode ser explicado pelo curto período de tempo que as plantas foram expostas ao estresse hídrico. O tratamento ALCS3 foi o único que apresentou diferenças de crescimento entre caule sem estresse e com estresse. O fato de a levedura ter sido extraída de um solo contaminado com alumínio pode ter contribuído para esse resultado, visto que plantas expostas ao alumínio apresentam diminuição de crescimento em suas raízes (BARCELO; POSCHENRIEDER, 2002). A presença dessa levedura em um solo contaminado indica sua resistência a esse mineral e pode indicar sua capacidade de diminuir os danos causados pelo alumínio em plantas, ou seja, a diminuição no crescimento das raízes.

Contudo, esse tratamento apresentou todas as médias de peso seco maiores que as médias obtidas pelo tratamento controle. Além disso, sua média de peso seco da parte aérea com estresse não foi diferente das médias apresentadas pelos outros tratamentos com inoculação de leveduras. Esses tratamentos também apresentaram médias de crescimento maiores que o tratamento controle, com exceção do

tratamento TL3 que apresentou média de peso seco dos caules sem estresse igual a todos os outros tratamentos. Entretanto, levando em consideração o efeito do estresse abiótico, podemos inferir que todas as leveduras estudadas foram efetivas na promoção do crescimento da parte aérea e na proteção aos danos causados pelo estresse hídrico.

Já as raízes de uma planta exposta ao estresse hídrico tendem a crescer mais a procura de água (MAHAJAN *et al.*, 2005). No presente estudo o único tratamento que diferiu do tratamento controle quanto à média de peso seco de raízes foi ALCS3. O micro-organismo aumentou a resposta positiva que a planta comumente já apresenta frente a esse tipo de estresse abiótico, mostrando-se eficaz como promotor do crescimento de plantas contra os danos do estresse hídrico causados a raiz. Visto que a média de peso seco da raiz foi a maior apresentada acredita-se que o crescimento mais elevado da raiz tenha ocorrido em decorrência da procura por água por parte da planta.

O uso de poucas plantas por tratamento, e a divisão dessas entre plantas que passaram ou não por exposição ao estresse abiótico, é considerado fator contribuinte para o grande erro amostral apresentado nas médias desse ensaio. A utilização de uma maior quantidade de amostras por tratamento teria baixado os erros amostrais tornando mais fácil a visualização e discussão dos resultados.

A promoção do crescimento de plantas e a amenização dos danos causados por estresse hídrico em plantas de tomate por meio da inoculação de micro-organismos promotores do crescimento de plantas também já foi observada em outros trabalhos, alguns deles, como o de Subramanian, Santhanakrishnan e Balasubramanian (2016), afirmam que o aumento do estado nutricional da planta, principalmente quanto aos níveis de P é um dos fatores que diminuem os danos causados pelo estresse hídrico em plantas inoculadas com micro-organismos promotores do crescimento de plantas. Porém, o mesmo não pode ser afirmado no presente ensaio, visto que níveis de nutrientes não foram medidos e nenhuma das leveduras estudadas apresentou a habilidade de solubilizar fosfato.

A planta *Solanum lycopersicum* foi escolhida para a realização desse ensaio, pois as leveduras *I. orientalis* e *C. intermedia* foram isoladas da folha de um tomateiro. Por esse motivo, levantou-se a hipótese de que elas teriam resultados positivos como micro-organismos promotores do crescimento de plantas em tomate. Apesar de não terem apresentado as maiores médias, as duas leveduras apresentaram resultados positivos como promotoras do crescimento de plantas frente aos danos causados

pelo estresse hídrico em tomates. Não foram encontrados trabalhos prévios sobre a relação dessas leveduras com tomateiros.

5- Conclusões

Os micro-organismos estudados não foram efetivos como promotores do crescimento e potencializadores da formação de nódulos por *Rhizobium tropici* 899 em feijão. No ensaio com arroz, na comparação entre tratamentos, sem levar em consideração o estresse, as plantas tratadas com as cepas TL1 e TL3 apresentaram peso seco médio de raiz maior que o tratamento controle. Contudo, levando-se em consideração somente as plantas que receberam estresse, não houve diferenças estatísticas entre os pesos médios de raiz entre tratamentos. No ensaio com tomateiros, *S. kiliense* apresentou resultados positivos no crescimento da raiz em presença de estresse. Quanto ao crescimento da parte aérea, todos os micro-organismos estudados mostraram-se mais eficientes que o tratamento controle no crescimento sob estresse hídrico.

6- Considerações finais

São necessários mais estudos para esclarecer as capacidades promotoras do crescimento de plantas dos quatro micro-organismos aqui estudados. A mortalidade das plantas de arroz foi bastante elevada, indicando que é conveniente repetir o ensaio em um período do ano mais apropriado. Mais ensaios em plantas com os demais micro-organismos utilizados nesse estudo também podem resultar em resultados satisfatórios. Inclusive ensaios que testem a capacidade antifúngica desses micro-organismos, uma vez que muitas leveduras já se mostraram eficazes no biocontrole de patógenos em trabalhos anteriormente publicados.

Referências

AMPRAYN, K. O. *et al.* 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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.11.009>>.0929-1393.

ARTECA, R. N. **Plant growth substances: principles and applications.** The Pennsylvania State University: Springer science+business Media B.v, 1996. 332 p. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?hl=ptBR&lr=&id=tzToBwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR17&dq=ARTECA,+N.+Plant+growth+substances:+principles+and+applications.+Chapman+&+Hall.+1995.+332+p.&ots=yY7VbI50X6&sig=f8a_1MjAvpnXZ9KDb4lf04aT40#v=onepage&q&f=false>. Acesso em: 29 maio 2017.

ASCH, F.; WOPEREIS, M. C S. Responses of field-grown irrigated rice cultivars to varying levels of floodwater salinity in a semi-arid environment. **Field Crops Research** v. 70, n. 2, p. 127–137, 2001.0378-4290.

BAL, H. B. *et al.* Isolation of ACC deaminase producing PGPR from rice rhizosphere and evaluating their plant growth promoting activity under salt stress. **Plant and Soil** v. 366, n. 1–2, p. 93–105, 2013.0032-079X.

BARCELO, J.; POSCHENRIEDER, C.. Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. v. 48, p. 75–92, 2002.

BEDOR, C. N. G. *et al.* Vulnerabilidades e situações de riscos relacionados ao uso de agrotóxicos na fruticultura irrigada. **Revista Brasileira de Epidemiologia** v. 12, n. 1, p. 39–49, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-790X2009000100005&lng=en&nrm=iso&tlng=pt%5Cnhttp://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-790X2009000100005&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>.1415-790X.

BOTHA, A. The importance and ecology of yeasts in soil. **Soil Biology and Biochemistry** v. 43, n. 1, p. 1–8 , 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.10.001>>.0038-0717.

BROUGHTON, W. J.; DILWORTH, M. J. Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. **The Biochemical journal** v. 125, n. 4, p. 1075–80 , 1971. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5144223>%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1178271>.0264-6021 (Print)r0264-6021 (Linking).

COMBY, M. *et al.* Screening of wheat endophytes as biological control agents against Fusarium head blight using two different in vitro tests. **Microbiological Research** v. 202, n. November 2016, p. 11–20 , 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0944501316308278>>.

COSTAS, M.; DEIVE, F. J.; LONGO, M. A.. Lipolytic activity in submerged cultures of *Issatchenkia orientalis*. **Process Biochemistry** v. 39, n. 12, p. 2109–2114 , 2004.

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, n. 1, p. 69–75 , 2004.1364-5072 (Print)r1364-5072 (Linking).

FIGUEIREDO, M. V. B. *et al.* Alleviation of drought stress in the common bean (*Phaseolus vulgaris L.*) by co-inoculation with *Paenibacillus polymyxa* and *Rhizobium tropici*. **Applied Soil Ecology** v. 40, n. 1, p. 182–188 , 2008.

FORNI, C.; DUCA, D.; GLICK, B. R.. Mechanisms of plant response to salt and drought stress and their alteration by rhizobacteria. **Plant and Soil** p. 1–22 , 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11104-016-3007-x>>.

GLICK, B. R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. **Microbiological Research** v. 169, n. 1, p. 30–39 , 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.009>>.1618-0623

(Electronic)r0944-5013 (Linking).

GLICK, B. R. *et al.* Promotion of Plant Growth by Bacterial ACC Deaminase. **Critical Reviews in Plant Sciences** v. 26, n. 5–6, p. 227–242, 2007. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07352680701572966>>.0735-2689.

GONTIA-MISHRA, I.; SASIDHARAN, S.; TIWARI, S.. Recent developments in use of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase for conferring tolerance to biotic and abiotic stress. **Biotechnology Letters** v. 36, n. 5, p. 889–898, 2014.

GREGORIO, G. B. *et al.* Progress in breeding for salinity tolerance and associated abiotic stresses in rice. **Field Crops Research** v. 76, n. 2–3, p. 91–101, 2002.0378-4290.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D.I. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *Cal. Agric. Exp. Stat. Circ.* 347, 1–32.

IGNATOVA, L. V. *et al.* Plant growth-promoting and antifungal activity of yeasts from dark chestnut soil. **Microbiological Research** v. 175, p. 78–83, 2015.

INCA (Brasil). **Brasil lidera o ranking de consumo de agrotóxicos**. 2015. Elaborada por Flávia Milhorence. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/comunicacao/informacao/site/home/namidia/brasil_lidera_ranking_consumo_agrotoxicos>. Acesso em: 30 maio 2017.

JAIBOON, K. *et al.* Yeasts from peat in a tropical peat swamp forest in Thailand and their ability to produce ethanol, indole-3-acetic acid and extracellular enzymes. **Mycological Progress** v. 15, n. 7, p. 755–770, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11557-016-1205-9>>.

JHA, Y.; SUBRAMANIAN, R. B.; PATEL, S.. Combination of endophytic and rhizospheric plant growth promoting rhizobacteria in *Oryza sativa* shows higher accumulation of osmoprotectant against saline stress. **Acta Physiologiae Plantarum** v. 33, n. 3, p. 797–802, 2011.1173801006.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. São Paulo: Guanabara Koogan, 2004. 452 p.

KHAN, M. Y. *et al.* Antioxidant compounds and minerals in tomatoes by *Trichoderma*-enriched biofertilizer and their relationship with the soil environments. **Journal of Integrative Agriculture** v. 16, n. 3, p. 691–703, 2017. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S2095-3119\(16\)61350-3](http://dx.doi.org/10.1016/S2095-3119(16)61350-3)>.

LEE, G. *et al.* Foliar application of the leaf-colonizing yeast *Pseudozyma churashimaensis* elicits systemic defense of pepper against bacterial and viral pathogens. **Scientific Reports** v. 7, n. January, p. 39432, 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/srep39432>>.

LIU, W. *et al.* Characteristics of metal-tolerant plant growth-promoting yeast (*Cryptococcus* sp. NSE1) and its influence on Cd hyperaccumulator *Sedum plumbizincicola*. **Environmental Science and Pollution Research** v. 23, n. 18, p. 18621–18629, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11356-016-7041-2>>.

LUTTS, S.; KINET, J. M.; BOUHARMONT, J. NaCl-induced Senescence in Leaves of Rice (*Oryza sativa* L.) Cultivars Differing in Salinity Resistance. **Annals of Botany** v. 78, n. 3, p. 389–398, 1996. Disponível em: <<http://aob.oxfordjournals.org/content/78/3/389.abstract>>.0305-7364.

MA, L. *et al.* Cross Adaptation Tolerance in Rice Seedlings Exposed to PEG Induced Salinity and Drought Stress. **International Journal of Agriculture and Biology** v. 18, n. 3, p. 535–541, 2016. Disponível em: <http://www.fspublishers.org/published_papers/30913_...pdf>.

MADIGAN, M. T. *et al.* **Brock Biology of Microorganisms**. 13. ed. San Francisco: Pearson Education, Inc., Publishing As Benjamin Cummings, 2012. 1155 p.

MAHAJAN, S. *et al.* Cold, salinity and drought stresses: an overview. **Archives of biochemistry and biophysics** v. 444, n. 2, p. 139–58, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16309626>>.0003-9861.

MARCHESAN, E. *et al.* Rice herbicide monitoring in two Brazilian rivers during the rice growing season. **Scientia Agricola** v. 64, n. 2, p. 131–137, 2007. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90162007000200005&lng=en&nrm=iso&tlng=en>.0103-9016.

MASSON-BOIVIN, C. *et al.* Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? **Trends in Microbiology** v. 17, n. 10, p. 458–466, 2009.0966842X (ISSN).

MOLLER, L. *et al.* The role of *Cryptococcus laurentii* and mycorrhizal fungi in the nutritional physiology of *Lupinus angustifolius* L. hosting N₂-fixing nodules. **Plant and Soil** p. 1–16, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11104-016-2973-3>>.

MUKHERJEE, S.; SEN, S. K. Exploration of novel rhizospheric yeast isolate as fertilizing soil inoculant for improvement of maize cultivation. **Journal of the Science of Food and Agriculture** v. 95, n. 7, p. 1491–1499, 2015.

NAKBANPOTE, W. *et al.* Salt-tolerant and plant growth-promoting bacteria isolated from Zn/Cd contaminated soil: identification and effect on rice under saline conditions. **Journal of Plant Interactions** v. 9, n. 1, p. 379–387, 2014. Disponível em:

<<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/17429145.2013.842000>>

NEVES, K. C. S.; PORTO, A. L. F.; TEIXEIRA, M. F. S. Screening of yeasts from Amazon Region for extracellular protease production. **Acta Amazonica** v. 36, n. 3, p. 299–306, 2006.

MUNNS, R.; TESTER, M.. Mechanisms of salinity tolerance. **Annual review of plant biology** v. 59, p. 651–81, 2008. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18444910>>.1543-5008 (Print)n1543-5008 (Linking).

NUTARATAT, P. *et al.* Plant growth-promoting traits of epiphytic and endophytic yeasts isolated from rice and sugar cane leaves in Thailand.

Fungal Biology v. 118, n. 8, p. 683–694, 2014. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2014.04.010>>.1878-6146.

QADIR, M. *et al.* Economics of salt-induced land degradation and restoration. **Natural Resources Forum** v. 38, n. 4, p. 282–295 , 2014.0165-0203.

RANE, M. *et al.* Application of *Glomus* sp . and *Pseudomonas diminuta* Reduce the Use of Chemical Fertilizers in Production of Potato Grown on Different Soil Types. **2nd International Conference on Agricultural and Biological Sciences** , 2004.

SAHARAN, B. S.; NEHRA, V. Plant Growth Promoting Rhizobacteria : A Critical Review. **Life Sciences and Medicine Research** v. 2011, p. 1–30 , 2011.

SCHWYN, B; NEILANDS, J.B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophore. **Analytical Biochemistry** v. 160, p. 47–56 , 1987.

SHAHAROONA, B.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z. A. Effect of plant growth promoting rhizobacteria containing ACC-deaminase on maize (*Zea mays* L.) growth under axenic conditions and on nodulation in mung bean (*Vigna radiata* L.). **Letters in Applied Microbiology** v. 42, n. 2, p. 155–159 , 2006.1472-765X.

SHAHZAD, R. *et al.* Inoculation of abscisic acid-producing endophytic bacteria enhances salinity stress tolerance in *Oryza sativa*. **Environmental and Experimental Botany** v. 136, p. 68–77 , 2017.

SINGH, C. S.; KAPOOR, A.; WANGE, S. S. The enhancement of root colonisation of legumes by vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi through the inoculation of the legume seed with commercial yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). **Plant and Soil** v. 131, n. 1, p. 129–133 , 1991.

SUBRAMANIAN, K. S.; SANTHANAKRISHNAN, P.; BALASUBRAMANIAN, P. Responses of field grown tomato plants to arbuscular mycorrhizal fungal colonization under varying intensities of drought stress. **Scientia Horticulturae** v. 107, n. 3, p. 245–253 , 2006.9894065449.

SUBRAMANIAN, P. *et al.* Endophytic bacteria improve nodule function and plant nitrogen in soybean on co-inoculation with

Bradyrhizobium japonicum MN110. **Plant Growth Regulation** v. 76, n. 3, p. 327–332 , 2015. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1007/s10725-014-9993-x>>.

TARAYRE, C. *et al.* Multiple analyses of microbial communities applied to the gut of the wood-feeding termite *Reticulitermes flavipes* fed on artificial diets. **Symbiosis** v. 65, n. 3, p. 143–155 , 2015.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil** v. 255, p. 571–586 , 2003.0032-079X.

VESSEY, J. K.; BUSS, T. J. *Bacillus cereus* UW85 inoculation effects on growth , nodulation , and N accumulation in grain legumes : Controlled-environment studies. **Canadian Journal of Plant Science** v. 85, n. 1991, p. 283–290 , 2002.

WILSON, C. L.; WISNIEWSKI, M. E. FRUITS AND VEGETABLES : AN EMERGING TECHNOLOGY *. **Annual Review of Phytopathology** v. 27, p. 425–441 , 1989.

YANG, J.; KLOPPER, J. W.; RYU, Choong Min. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. **Trends in Plant Science** v. 14, n. 1, p. 1–4 , 2009.1360-1385.

YOU, L. *et al.* Characteristics of yeast flora in Chinese strong-flavoured liquor fermentation in the Yibin region of China. **Journal of the Institute of Brewing** v. 122, n. 3, p. 517–523 , 2016.

ZLOCH, M. *et al.* Synthesis of siderophores by plant-associated metallotolerant bacteria under exposure to Cd²⁺. **Chemosphere** v. 156, p. 312–325 , 2016.