IV SIMPÓSIO ABC
ARGENTINA-BRASIL-CUBA
Sistemas de Produção e Sustentabilidade Agrícola:
Experiências na Argentina, Brasil e Cuba
Realização
Apoio

LEVEDURAS COM POTENCIAL PARA A PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO EM PLANTAS DE FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.)

Potential Yeasts for Plant Growth Promoting in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.)

Kerly Martinez ANDRADE[1] & Jerri Edson ZILLI[2]

[1]Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Agronomia-Ciência do Solo (UFRRJ).
kerlymar18@gmail.com
[2]Pesquisador da Embrapa Agrobiologia.

Resumo: Leveduras são fungos unicelulares que podem ser encontrados naturalmente na rizosfera e filosfera das plantas. Algumas espécies têm a capacidade de participar de vários processos importantes, como: controle biológico de fitopatógenos, produção de sideróforos e outros compostos conhecidos como promotores de crescimento de plantas. Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de leveduras na promoção do crescimento vegetal em culturas de importância agrícola, testes laboratoriais e em casa de vegetação foram realizados. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com 4 repetições, 11 tratamentos (inoculados e não inoculado). Leveduras foram cultivadas em meio líquido YM a 120 rpm, 28 ° C por 2 dias, as sementes foram inoculadas com uma proporção de 5 x 10^6 células de leveduras. As sementes foram distribuídas em vasos Leonard contendo areia e vermiculita em solução nutritiva. O crescimento foi avaliado por 40 dias após a inoculação. Ao final mostrou que 5 leveduras (*Occultifur brasiliensis, Yamadazyma riverae, Hyphopichia homilentoma, Spathaspora suhii, Torulaspsora* sp, *Candida* sp.) proporcionaram maior crescimento radicular em 23% e 18% na parte aérea e 25% na biomassa fresca total em comparação com o controle, indicando que essas leveduras executam mecanismos que proporcionam maior crescimento das plantas.

Palavras-chave: biotecnologia, fitohormônios, rizosfera, sideróforos, solo.

Abstract: Yeasts are single-celled fungi that can be found naturally in the rhizosphere and phylosphere of plants. Some species can participate in several important processes such as: biological control of phytopathogens, production of siderophores and other compounds known as plant growth promoters. This work aimed to evaluate the action of promoting plant growth by yeasts in crops of agricultural importance, laboratory and greenhouse tests were performed. The experiment was conducted in a completely randomized design, with 4 replicates, 11 treatments (inoculated and not inoculated). Yeasts were grown in YM liquid medium at 120 rpm, 28°C for 2 days, the seeds were inoculated with a ratio of 5 x 10^6 yeast cells. The seeds were distributed in Leonard pots containing sand and vermiculite in nutrient solution. Growth was evaluated for 40 days after inoculation. The final showed that 5 yeasts (*Occultifur brasiliensis, Yamadazyma riverae, Hyphopichia homilentoma, Spathaspora suhii, Torulaspsora* sp, *Candida* sp.) Provided higher root growth in 23% and 18% in the shoot and 25% in total fresh biomass compared to control, indicating that these yeasts perform mechanisms that provide greater plant growth.

Keywords: biotechnology, phytohormones, rhizosphere, siderophores, soil.

Introdução

As Leveduras são um grupo fúngico polifilético pertencente ao Ascomycota e Basidiomycota, Kurtzman et al. (2011). Muitas leveduras são comuns no solo Botha, (2006) em áreas naturais Yurkov et al. (2012) e ecossistemas agrícolas Sláviková e Vadkertiová (2003). Alguns microrganismos tem a capacidade de promover o crescimento de plantas, entre eles as leveduras que apresentam grandes benefícios aos vegetais como a inibição de patógenos pela produção da toxina *killer* que pode causar a morte de outras espécies de leveduras, fungos filamentosos e bactérias, El-Tarabily (2004); El-Tarabily e Sivasithamparam (2006); Sansone et al. (2005); produção fitohormônios, Nassar et al. (2005); solubilização e disponibilização de fósforo (P), Enxofre (S), Falih e Wainwright (1995); Mirabal Alonso et al. (2008); Nitrogênio (N) e produção de sideróforos Sansone et al. (2005); *Yarrowia lipolytica* é uma levedura promotora do crescimento vegetal que auxilia na nutrição das plantas, Medina et al. (2004), como agentes no biocontrole de patógenos de pós colheita de produtos agrícolas Castoria et al. (2001); Druvefors et al. (2005); controle biológico de fitopatógenos de culturas no campo, Assis et al. (1999); El Tarabily (2004), e estimulação de associações micorrízicas, Vassileva, et al. (2000); Mirabal Alonso, et al. (2008).

Na atualidade pouco se conhece sobre as funções das leveduras no ambiente, ainda tem muito para ser descoberto, principalmente sobre o seu modo de ação frente a diversos ambientes e outros microrganismos. O desafio nesta área é a expansão do conhecimento sobre o comportamento da levedura em áreas com cultivo agrícola, pois existe um grande interesse na utilização de biofertilizantes para a diminuição do uso de fertilizantes químicos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação de promoção de crescimento vegetal por leveduras isoladas da rizosfera de plantas de feijão, em testes *in vitro* e *in vivo*.

Material e Métodos

Foram utilizadas sementes de feijão desinfestadas que foram semeadas em vasos Leonard em uma proporção 1:1 vermiculita e areia esterilizada. Para cada tratamento foram utilizadas 4 sementes inoculadas com 1000µL da suspensão de células $5x10^8$ de leveduras/ml. Para a produção do inóculo, foi realizado o cultivo da levedura em meio líquido YM (extrato de levedura, peptona, glicose e malte) em shaker a 120 rpm, 28 °C, por 48h. A contagem de células foi realizada em Câmara de Neubauer. A solução nutritiva de Norris foi trocada a cada 7 dias, as plantas permaneceram em casa de vegetação por 40 dias. Após a coleta, foi determinada altura da planta, diâmetro, matéria fresca de parte aérea e matéria seca da parte aérea e raiz. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com quatro repetições para cada tratamento.

Ensaio de solubilização de P

Para avaliar o potencial das leveduras analisadas quanto a solubilização de fosfatos insolúveis, foi utilizada a metodologia o Instituto de Pesquisa Botânica (NBRIP) suplementado com 0,5 g/L de extrato de levedura, Nautiyal (1999), foi inoculado, 10 µL de leveduras crescidas em tubos de ensaio em triplicata na placa, Em seguida as placas foram incubadas a 28°C durante 15 dias, um halo transparente ao redor da colônia foi utilizada para marcar a solubilização do fosfato.

Produção Acido indolacético AIA

A produção de AIA foi analisada pelo método modificado de Gordon e Weber (1951), utilizando *Torulaspora globosa* como cepa de referência. As estirpes foram cultivadas em meio YM suplementado com 0,1% de L-triptofano. As culturas foram incubadas por 7 dias a

28°C, e depois centrifugado a 15.000 rpm por 3 min. 1,5 mL do sobrenadante foi misturado com 1,5 mL de solução de Fe-$HClO_4$ (1 mL de $FeCl_3$ $_6H_2O$ 0,5 M em 75 mL $HClO_4$ de 35%) e incubado no escuro por 30 min. A concentração de AIA foi calculada a partir de uma curva padrão de AIA, medindo a absorbância das amostras e padrões a 530 nm.

Resultados e Discussão

Na Tabela 1 estão apresentadas as médias dos valores de altura da parte aérea e do comprimento da raiz das plantas de feijão após 35 dias de cultivo. A avaliação do comprimento da raiz e da parte aérea mostrou que as leveduras *Occultifur brasiliensis, Yamadazyma riverae, Hyphopichia homilentoma, Spathaspora suhii, Torulaspsora* sp, *Candida* sp., mostraram maior crescimento radicular em 23% e 18% na parte aérea e 25% na biomassa fresca total em comparação com o controle, indicando que essas leveduras desempenham um papel importante. mecanismos que proporcionam maior crescimento das plantas. Há relatos na literatura de resultados de promoção de crescimento de plantas por leveduras, Amprayan, et al (2012) também foi observado por Nakayan et al. (2013), que obtiveram resultados positivos na promoção de crescimento de plantas inoculadas com leveduras.

Tabela 1. Altura parte aérea (AP), diâmetro (Dm), massa fresca total (MFT), massa seca parte aérea (MST), massa seca raiz (MSR), de feijão comum (*P. vulgaris*) inoculados com 11 tratamentos diferentes.

Tratamentos	AP (cm)	Dm (mm)	MFPA	MSPA	MSR
			gramas planta $^{-1}$		
LA03	30,94 a	3,51 a	16,6 a	2,83 a	1,61 b
Y375	27,13	3,86 b	10,05 b	2,2 b	1,05 b
Y3456	27,69 b	3,28 b	12,7 b	2,09 b	1,1 b
Y379	30,88 a	3,81 b	14,5 a	2,64 b	1,24 b
Y444	32,88 a	4,38 a	15,6 a	3,2 a	1,5 b
Y682	33,06 a	4,44 a	17,6 a	2,5 b	1,6 b
XMD162	33,08 a	4,08 a	16,4 a	3,7 a	1,5 b
LA02	33,19 a	4,08 a	16,7 a	2,9 a	1,1 b
5S5S	33,38 a	3,94 a	17,5 a	3,17 a	1,3 b
LF22	34,48 a	4,60 a	19,9 a	3,88 a	1,68 b
Y409	37,56 a	3,80 b	19,5 a	3,69 a	1,61 b
Controle	24,94 a	3,37b	9,8 a	1,34 a	0,83 b
CV (%)	10,17	10,16	25,36	27,27 a	35,22

Médias com letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$)

A partir dos resultados obtidos nos experimentos de produção de AIA mostram que as leveduras produzem no meio de cultura com a presença do triptofano 0,01% a avalição foi feita durante um período (7 dias) tabela 2. Muitos trabalhos indicam que na presença de triptofano as leveduras conseguem produzir AIA. El-Tarabily (2004) a levedura *Trichosporon asahii*. Produziu 31,7 µg/mL, os estudos realizados por Nakayan, et al. (2013), mostraram que *Rh. mucilaginosa* e *M. caribbica* apresentaram valores de produção de 3 µg/mL de AIA. Nutaratat, (2014) relatou produção de 4,9 µg/mL de AIA, pelo isolado de *T. globosa.* Fu, et al. (2016), realizaram diferentes testes de AIA, em leveduras isoladas de *Drosera spatulata* Lab, obtendo resultados de concentrações de AIA que variam desde 610.63 ± 54.7 até 8.63 ± 1.4 $\mu g.mL^{-1}$ usando triptofano como precursor bioquímico. Neste estudo as leveduras produziram concentrações de AIA que variam de uma espécie a outra com uma concentração de 46,65 até 10,21 $\mu g.mL^{-1}$.

Tabela 2. Produção líquida média (ao longo de 7 dias) de AIA pelas linhagens de levedura, na presença de triptofano, em experimento *in vitro.*

Linhagens	***L-Triptofano 0,01%***	**Produção de AIA µg.mL^{-1}**
Candida sp.	com	30,52
Torulaspora sp.	com	46,65
Torulaspora globosa	com	23,07
Spathaspora suhii	com	24,08
Occultifur brasiliensis	com	11,12
Hyphopichia homilentoma	com	10,2110,2
Yamadazyma riverae	com	21,83

A capacidade de solubilização de fosfato inorgânico, em meio de cultura sólido pelas leveduras foi positivo nas condições testadas, (figura 1), as leveduras com melhores resultados, foram selecionadas para ser avaliadas em plantas de feijão. Na literatura há vários trabalhos mostrando que as leveduras conseguem ser solubilizadoras de fosfato. Al-Falih (2005) observou que as espécies *Candida tropicalis*, *Geotrichum capitatum* e *Rhodotorula rubra* solubilizaram fosfato de cálcio no meio de cultura; Nakayan, (2013) mostrou que as leveduras *M. guilliermondii* e *M. guilliermodii* (CC1), apresentaram a capacidade de solubilização de fosfato. Park, et al. (2013), Onyia & Anyanwu (2013), também relataram leveduras com capacidade de solubilizar fosfatos *in vitro*. Fu, et al. (2016) avaliaram a capacidade de solubilização de fosfatos de leveduras isoladas da rizosfera e filosfera de *Drosera spatulata* Lab. Mostrando que 18 isolados apresentaram atividade solubilizante.

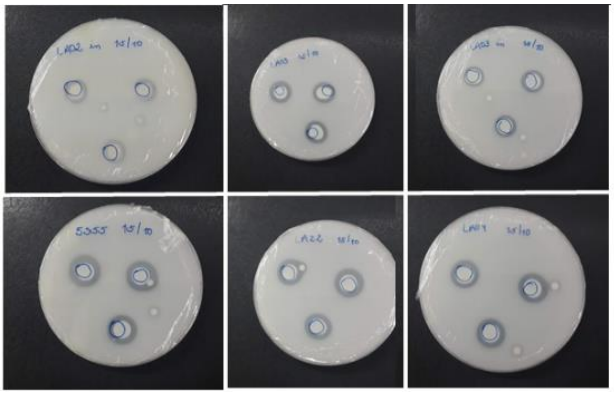

Figura1. Solubilização de fosfatos insolúveis em meio de cultura N-Brip

Conclusões

As leveduras analisadas têm a capacidade de produzir AIA, mobilizar fosfatos inorgânicos.

A aplicação das leveduras nas sementes de feijão resultou em melhor crescimento das plantas.

Esses resultados apoiam a prospecção contínua de isolados de leveduras para inclusão em inoculantes comerciais para fins sustentáveis na agricultura.

Referências Bibliográficas

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

AMPRAYAN, K.; et al. **Plant growth promoting characteristics of soil yeast (*Candida tropicalis* HY) and its effectiveness for promoting rice growt**h. Applied Soil Ecology, v.61, p.295-299, 2012.

ASSIS, S.M.P.; MARIANO, R.L.R.; MICHEREFF, S.J.; SILVA, G.; MARANHÃO, E.A.A. **Antagonism of yeast to Xanthomonas campestris pv. Campestris on cabbage phylloplane in field.** Revista de Microbiologia, São Paulo, v.30, p.191-195, 1999.

BOTHA, A., Yeasts in soil. In: Rosa, C., Peter, G. (Eds.), **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts.** Springer, Berlin, Germany, pp. 221–240. 2006.

CASTORIA, R.; DE CURTIS, F.; LIMA, G.; CAPUTO, L.; PACÍFICO, S.; DE CICCO, V. ***Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its modes of action**. Postharvest Biology and Biotechnology, v.22, p.7-17, 2001.

DRUVEFORS, U.A.; PASSOTH, V.; SCHNURER, J. **Nutrient effects on biocontrol of *Penicillium roqueforti* by *Pichia anomala* J121 during airtight storage of wheat**. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.71, p.1865-1869, 2005.

EL-TARABILY, K.A. **Suppression of *Rhizoctonia Solani* Diseases of Sugar Beet by Antagonistic and Plant growth-promoting yeast.** Journal of Applied Microbiology, Bedford, v.96, p.69-75, 2004.

EL-TARABILY, K.A.; SIVASITHAMPARAM, K. **Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters.** Biomedical and Life ciences, 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***. Mycol. Res. 99, 200–204. 1995.

FU, SHIH-FENG, et al. **Plant growth-promoting traits of yeasts isolated from the phyllosphere and rhizosphere of Drosera spatulata Lab.** fungal biology I20, p433 – 448, 2016.

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

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W.; BOEKHOUT, T (Ed.). **The Yeasts: a taxonomic study**. Peoria, IL, EUA 5th edition: Elsevier, 2011.

MEDINA, A.; VASSILEVA, M.; CARAVACA, F.; ROLDÁN, A.; AZCÓN, R. **Improvement of soil characteristics and growth of *Dorycnium pentaphyllum* by amendment with agrowastes and inoculation with AM fungi and/or the yeast *Yarrowia lipolytica***. Chemosphere, Oxford, v.56, p.449-456, 2004.

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

NAKAYAN, P. et al. **Phosphate-solubilizing soil yeast *Meyerozyma guilliermondii* CC1 improves maize (*Zea mays* L.) productivity and minimizes requisite chemical fertilization.** Plant Soil, v.373, p.301-315, 2013.

NASSAR, A., EL-TARABILY, K., SIVASITHAMPARAM, K., **Promotion of plant growth by an auxin-producing isolate of the yeast *Williopsis saturnus* endophytic in maize (*Zea mays* L.) roots.** Biol. Fert. Soils 42, 97–108. 2005.

NAUTIYAL, C. S. **An effect microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms**. **FEMS Microbiol. Letters**, v. 170, n. 1, p. 265-270, 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.683–694, 2014.

ONYIA CE, ANYANWU CU, **Comparative study on solubilization of tri-calcium phosphate (TCP) by phosphate solubilizing fungi (PSF) isolated from Nsukka pepper plant rhizosphere and root free soil**. Journal of Yeast and Fungal Research 4: 52e57. 2013.

PARK IC. et al. **Characterization of phosphate solubilizing yeasts from Korean traditional fermented foods.** The Korean Journal of Mycology 41: 218e224. 2013.

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 Biol. Tech. 35, 245–251. 2005.

SLÁVIKOVÁ, E., VADKERTIOVÁ, R. **The diversity of yeasts in the agricultural soil.** J. Basic Microbiol. 43, 430–436. 2003.

VASSILEVA, M., AZCON, R., BAREA, J.-M., VASSILEV, N. **Rock phosphate solubilization by free and encapsulated cells of *Yarowia lipolytica*.** Process Biochem. 35, 693–697, 2000.

YURKOV, A., et al. **Local climatic conditions constrain soil yeast diversity patterns in Mediterranean forests, woodlands and scrub biome.** FEMS Yeast Res. 16. 2016.