



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

**LEVEDURAS PRODUTORAS DE AIA E SOLUBILIZADORAS DE P VISANDO A  
PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE TOMATEIRO**

**THAÍS BORGES DE OLIVEIRA**

**Araras  
2016**



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

**LEVEDURAS PRODUTORAS DE AIA E SOLUBILIZADORAS DE P VISANDO A  
PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE TOMATEIRO**

**THAÍS BORGES DE OLIVEIRA**

**ORIENTADORA: PROF. 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**

**2016**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar  
Processamento Técnico  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

O481 Oliveira, Thaís Borges de  
Leveduras produtoras de AIA e solubilizadoras de  
P visando a promoção de crescimento de tomateiro /  
Thaís Borges de Oliveira. -- São Carlos : UFSCar,  
2016.  
65 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de  
São Carlos, 2016.

1. AIA . 2. *Torulaspora globosa* . 3. *Trichosporon  
asahii* . 4. *Rhodotorula mucilaginosa* . 5. *Meyerozyma  
guilliermondii*. I. Título.



---

**Folha de Aprovação**

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Thaís Borges de Oliveira, realizada em 26/08/2016:

---

Profa. Dra. Marcia Maria Rosa Magri  
UFSCar

---

Profa. Dra. Silyana Perissatto Meneghin  
UFSCar

---

Prof. Dr. Fabrício Rossi  
USP

*A minha pequena e sorridente prima **Carolina Funari de Oliveira***

*(in memoriam).*

*Dedico*

*Ofereço...*

*às duas pessoas que me enchem de alegria nessa vida, que são verdadeiras bases para mim: minha pequena irmã **Alicia**, por quem faço o que for preciso para vê-la feliz; e*

*ao meu namorado **Luis Fernando**, amor além da vida.*

**AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer, primeiramente, a *Deus*, pela oportunidade de realizar o mestrado e por ser suporte em todos os obstáculos enfrentados.

À *Universidade Federal de São Carlos, Campus de Araras*, pela formação profissional.

Ao *Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados* e todos os *Professores* envolvidos, pelos ensinamentos durante as disciplinas.

À minha orientadora *Professora Dra. Márcia Maria Rosa Magri*, pela orientação, por todo aprendizado durante a graduação e pós-graduação, pela paciência para ensinar e também pelos momentos de distração.

Aos colegas do *LAMAM*, em especial à *Luana Godoi*, que me ajudou bastante no desenvolvimento do projeto, tornando os momentos sempre mais agradáveis e alegres.

Aos professores *Dr. Eduardo D’Ava Mariano, Dra. Ane Hackbart de Medeiros, Dra. Silvana Perissatto Meneghin e Dr. Fabrício Rossi* pela participação na banca de qualificação e/ou defesa e pelas importantes sugestões.

Às minhas companheiras de apartamento *Jéssica Araújo e Ana Carolina Arantes*, que estiveram ao meu lado compartilhando todos os momentos nesses dois anos.

Pelo incentivo dos meus familiares, em especial dos meus pais *Nilton Paiva de Oliveira e Célia Mara Borges de Oliveira*; da minha irmã *Alícia Borges de Oliveira*; dos meus padrinhos *André Negrini e Jaqueline*

*Negrini*; dos meus sogros *Antônio Marcos da Silva* e *Alessandra de Jesus*; e do meu namorado *Luis Fernando Briguelli*.

Agradeço a todos que de alguma maneira contribuíram com a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

## SUMÁRIO

	Página
ÍNDICE DE TABELAS .....	i
ÍNDICE DE FIGURAS .....	ii
RESUMO .....	iii
ABSTRACT .....	iv
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	4
2.1 Geral .....	4
2.2 Específicos .....	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	5
3.1 Micro-organismos edáficos, rizosféricos e epífitos .....	5
3.2 Micro-organismos Promotores de Crescimento Vegetal (MPCV) .....	8
3.3 Produção de auxinas por micro-organismos .....	10
3.4 Solubilização de fósforo por micro-organismos .....	12
3.5 Leveduras .....	13
3.6 Leveduras rizosféricas promotoras de crescimento vegetal .....	14
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	17
4.1 Material biológico .....	17
4.2 Avaliação da produção de ácido indolacético (AIA) .....	19
4.2.1 Seleção de linhagens de leveduras produtoras de AIA .....	19
4.2.2 Avaliação da produção de AIA .....	19
4.2.3 Quantificação do crescimento de células de levedura .....	20
4.3 Solubilização de fosfato .....	20
4.3.1 Seleção de linhagens de leveduras com potencial de solubilização de fosfato inorgânico em meio de cultura sólido .....	20
4.3.2 Solubilização de fosfato tricálcico em meio de cultura líquido .....	21
4.4 Avaliação do desenvolvimento de plantas de tomate inoculadas com a levedura <i>T. globosa</i> (5S55) .....	22
4.5 Análise estatística .....	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	26
5.1 Produção de ácido indolacético (AIA) pelos isolados de	

levedura, em testes <i>in vitro</i> .....	26
5.2 Solubilização de fosfato .....	35
5.2.1 Seleção de linhagens de leveduras com potencial de solubilização de fosfato inorganico em meio de cultura sólido .....	35
5.2.2 Quantificação da solubilização de fosfato tricálcico pelos isolados de levedura, em meio de cultura líquido.....	36
5.3 Desenvolvimento de mudas de tomate inoculadas com a levedura <i>T. globosa</i> (5S55).....	41
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	47
7. LITERATURA CITADA .....	49

## ÍNDICE DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1</b> Origem dos isolados de levedura estudados .....	17
<b>Tabela 2</b> Definição dos tratamentos utilizados no experimento em casa de vegetação.....	24
<b>Tabela 3</b> Produção líquida média (ao longo de 7 dias) de AIA pelas linhagens de levedura, na presença e ausência de triptofano, em experimento <i>in vitro</i> .....	26
<b>Tabela 4</b> pH médio do meio de cultura BD com cultivo da levedura.....	33
<b>Tabela 5</b> Médias do fósforo solubilizado pelas linhagens de levedura, em experimento <i>in vitro</i> através de método colorimétrico de azul de molibdênio ....	37
<b>Tabela 6</b> Valores médios de pH do meio de cultura Pikovskaya com cultivo da levedura.....	40
<b>Tabela 7</b> Valores médios de altura de planta (cm) e comprimento de raiz (cm) dos tomates, mantidos em casa de vegetação por 45 dias.....	42
<b>Tabela 8</b> Influência da levedura <i>T. globosa</i> (5S55) na altura de plantas (cm) e comprimento de raiz (cm) de tomate, em experimento em casa-de-vegetação.....	42
<b>Tabela 9</b> Altura de planta (cm) e Comprimento de raiz (cm) nas diferentes concentrações de células da levedura <i>T. globosa</i> (5S55), em experimento em casa-de-vegetação .....	43
<b>Tabela 10</b> Massa seca (g) da parte aérea (PA) e da raiz (R) dos tomates .....	44
<b>Tabela 11</b> Massa seca (g) da parte aérea dos tomates, considerando apenas os tratamentos com levedura e a testemunha.....	45
<b>Tabela 12</b> Efeito da glicose e do triptofano na massa seca (g) de raiz dos tomates, cultivados em casa-de-vegetação .....	45

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<p><b>Figura 1</b> Isolados das leveduras: (a) <i>T. globosa</i> (linhagem 5S51); (b) <i>T. globosa</i> (linhagem 5S55); (c) <i>T. asahii</i> (linhagem 4C06); (d) <i>T. asahii</i> (linhagem 3S44); (e) <i>Rh. mucilaginoso</i> (linhagem 2F32); (f) <i>M. guilliermondii</i> (linhagem 3C98) .....</p>	18
<p><b>Figura 2</b> Coloração rosa indica a presença de AIA no meio, após reação com Reagente de Salkowski; quanto mais intensa a cor, maior a concentração de AIA na solução.....</p>	20
<p><b>Figura 3</b> Análise de fosfato solúvel pela técnica colorimétrica de azul de molibidênio; quanto mais intensa a cor, maior a concentração de fósforo solubilizado.....</p>	22
<p><b>Figura 4</b> Plantas de tomate inoculadas ou não com a levedura <i>T. globosa</i> (5S55), em experimento em casa-de-vegetação.....</p>	24
<p><b>Figura 5</b> Produção líquida de AIA (A) e Crescimento celular (B) das leveduras <i>T. globosa</i> (5S51) (1), <i>Rh. mucilaginoso</i> (2F32) (2) e <i>T. globosa</i> (5S55) (3); teste Skott-Knott a 5% de significância .....</p>	31
<p><b>Figura 6</b> Produção de AIA (A) e Valores de pH no meio (B) para <i>T. globosa</i> (5S51) (1), <i>Rh. mucilaginoso</i> (2F32) (2) e <i>T. globosa</i> (5S55) (3); teste Skott-Knott a 5% de significância .....</p>	34
<p><b>Figura 7</b> Formação de halo de solubilização de fosfato inorgânico pelos dois isolados de levedura <i>Torulaspóra globosa</i> .....</p>	35
<p><b>Figura 8</b> Fósforo solúvel (A) e pH (B) para as leveduras <i>T. globosa</i> (5S55) (1), <i>T. globosa</i> (5S51) (2) e <i>M. guilliermondii</i> (3C98) (3); teste Skott-Knott a 5% de significância.....</p>	38

## LEVEDURAS PRODUTORAS DE AIA E SOLUBILIZADORAS DE P VISANDO A PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE TOMATEIRO

**Autor:** THAÍS BORGES DE OLIVEIRA

**Orientadora:** PROFA. DRA. MÁRCIA MARIA ROSA MAGRI

### RESUMO

Micro-organismos Promotores de Crescimento Vegetal (MPCV) apresentam a habilidade de produzir compostos que estimulam o desenvolvimento das plantas por meio de diferentes mecanismos, como a produção de hormônios vegetais e a solubilização de minerais. Considerando estes aspectos, este trabalho teve por objetivo avaliar o potencial de linhagens de leveduras como promotoras de crescimento vegetal, através da avaliação *in vitro* da produção de ácido indolacético e solubilização de fosfato, e da avaliação *in vivo* através da inoculação da linhagem com melhores resultados em mudas de tomate. Foram avaliadas seis linhagens de levedura pertencentes ao banco de micro-organismos do Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM - CCA, UFSCar). Para a avaliação da produção de AIA pelos isolados foi utilizada a metodologia colorimétrica, modificada de diMenna (1957); para quantificação da solubilização de fosfato tricálcico foi utilizada o método colorimétrico do azul de molibdênio. O ensaio com mudas de tomate foi realizado em casa de vegetação com diferentes concentrações de células de *T. globosa* (5S55), e com adição ou não de glicose e triptofano. Os resultados mostraram que os isolados de *T. globosa* e o isolado de *Rhodotorula mucilaginosa* produziram AIA na presença de triptofano; os isolados de *T. globosa* e o isolado de *Meyerozyma guilliermondii* solubilizaram fosfato inorgânico em meio líquido. A levedura *T. globosa* (5S55) promoveu o crescimento das mudas de tomate, com aumentos significativos no comprimento da parte aérea e raiz. Conclui-se que os isolados de *T. globosa*, *Rh. mucilaginosa* e *M. guilliermondii* apresentam potencial para a melhoria da produção vegetal através da produção de AIA e/ou solubilização de fosfato; a levedura *T. globosa*, isolado 5S55, mostrou ser capaz de promover o crescimento de mudas de tomate.

**Palavras-chaves:** AIA. *Torulaspora globosa*. *Trichosporon asahii*. *Rhodotorula mucilaginosa*. *Meyerozyma guilliermondii*.

## LEVEDURAS PRODUTORAS DE AIA E SOLUBILIZADORAS DE P VISANDO A PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE TOMATEIRO

**Autor:** THAÍS BORGES DE OLIVEIRA

**Orientadora:** PROFA. DRA. MÁRCIA MARIA ROSA MAGRI

### ABSTRACT

Microorganisms Plant Growth Promoters (MPCV) have the ability to produce compounds which stimulate plant growth by different mechanisms, such as the production of plant hormones and solubilization of minerals. Considering these aspects, this study aimed to evaluate the potential of yeast strains as plant growth promoters by producing indole acetic acid (IAA) and phosphate solubilization, and its inoculation of tomato seedlings. Six yeast strains were evaluated belonging to bank microorganisms Agricultural Microbiology and Molecular Laboratory (LAMAM - CCA, UFSCar). For the evaluation of IAA production by isolates the colorimetric method was used, modified DiMenna (1957); for quantification of tricalcium phosphate solubilization was used to colorimetric method of molybdenum blue. The test with tomato seedlings was conducted in a greenhouse with different cell concentrations of *T. globosa* (5S55) and with or without addition of glucose and tryptophan. The results showed that isolates of *T. globosa* and *Rh. mucilaginosa* produced IAA in the presence of tryptophan; the isolates of *T. globosa* and *M. guilliermondii* solubilized inorganic phosphate in a liquid medium. The isolate *T. globosa* (5S55) promoted the growth of tomato seedlings, with significant increases in the length of shoot and root. In conclusion, the isolates of *T. globosa*, *Rh. mucilaginosa* and *M. guilliermondii* have the potential for improving plant production by IAA production and / or phosphate solubilization; the yeast *T. globosa* (5S55) was shown to promote growth of tomato plants.

**Key-words:** IAA. *Torulaspora globosa*. *Trichosporon asahii*. *Rhodotorula mucilaginosa*. *Meyerozyma guilliermondii*.

## 1. INTRODUÇÃO

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

O estudo de processos naturais, com o emprego de micro-organismos autóctones, capazes de proteger e auxiliar o desenvolvimento da planta se apresenta como uma alternativa na busca de uma produção agrícola mais sustentável. O conhecimento das funções dos micro-organismos no solo, porém, continua sendo um desafio aos cientistas; o objetivo no estudo da microbiota do solo é estimular os micro-organismos através do manejo, ou adicioná-los no ambiente de forma a cumprir sua função benéfica no processo. É possível encontrar na literatura diversos trabalhos sobre micro-organismos rizosféricos, com destaque às rizobactérias, com excelentes resultados na promoção do desenvolvimento vegetal e no controle biológico de fitopatógenos; outro grupo bastante estudado são os micro-organismos endofíticos, que à semelhança das rizobactérias apresentam, em

laboratório, potencial emprego no favorecimento de diversas culturas de interesse econômico.

Micro-organismos conhecidos como promotores de crescimento vegetal (MPCV) apresentam a habilidade de produzir compostos capazes de estimular o desenvolvimento vegetal por meio de diferentes mecanismos, como a produção de hormônios vegetais, através do controle biológico de fitopatógenos e indução de resistência vegetal, além da solubilização de fosfatos e disponibilização de minerais na solução do solo, promovendo uma melhor nutrição para as plantas (GRAY & SMITH, 2005).

O grupo das Auxinas, através de seu principal representante, o ácido indolacético (AIA), é uma classe de fitormônios produzido pelos MPCV conhecida por estimular de forma rápida, e em longo prazo, respostas às plantas (CLELAND, 1990). Diversos micro-organismos, incluindo bactérias (KHALID et al., 2004; AHMAD E KIBRET, 2014), fungos filamentosos (FLOCH et al., 2003; GRAVEL et al., 2007; HOYOS-CARVAJAL et al., 2009) e leveduras (EL-TARABILY, 2004; NUTARATAT et al., 2014) são capazes de produzir quantidades significativas de AIA e promover efeitos importantes no crescimento e desenvolvimento vegetal. O crescimento vegetal também pode ser estimulado de forma mais direta pelo aumento na disponibilidade de nutrientes para as plantas, pela solubilização de fosfato inorgânico, através da produção de ácidos orgânicos, e pela mineralização de fosfato orgânico, por meio de fosfatases. Há um grande interesse na aplicação de biofertilizantes microbianos para a redução do uso de fertilizantes químicos.

O fracasso destes grupos de micro-organismos como constituinte de inoculantes comerciais se deve, principalmente, a falta de reprodutibilidade dos resultados obtidos no laboratório em campo, uma vez que o micro-organismo, para ser capaz de auxiliar a planta, deve ser competente, isto é, precisa sobreviver no ambiente do solo extremamente biodiverso, e com condições ambientais variáveis (temperatura, umidade, concentrações de gases, pH, nutrientes).

Leveduras são fungos unicelulares frequentemente empregados em processos biotecnológicos, com destaque à produção de etanol pela espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Esse grupo microbiano também pode ser encontrado na rizosfera das plantas, porém em número inferior se comparado às bactérias e fungos filamentosos; devido a este fato, pouco é conhecido sobre sua função neste ecossistema, sendo poucos os trabalhos encontrados na literatura sobre o assunto.

Uma grande diversidade de leveduras apresenta características para promoção de crescimento vegetal (CLOETE et al., 2009; NUTARATAT et al., 2014; LIMTONG et al., 2014), incluindo o controle de patógenos (EL-TARABILY, 2004; SANSONE et al., 2005; EL-TARABILY e SIVASITHAMPARAM, 2006; KORRES et al., 2011; YU et al., 2012; PLATANIA et al., 2012); produção de fitormônios (NASSAR et al., 2005); solubilização de fosfatos (FALIH e WAINWRIGHT, 1995; MIRABAL ALONSO et al., 2008; MUNDRA et al., 2011; HESHAM E MOHAMED, 2011); oxidação de nitrogênio e enxofre (FALIH e WAINWRIGHT, 1995); produção de sideróforos (SANSONE et al., 2005) e estímulo à colonização de raízes por fungos micorrízicos (VASSILEVA et al., 2000; MIRABAL ALONSO et al., 2008).

O desafio nesta área é a expansão do conhecimento sobre o comportamento da levedura em solos com cultivo agrícola e a descoberta de como esse grupo microbiano pode auxiliar o processo de produção, contribuindo para o equilíbrio do ecossistema e minimizando a aplicação de produtos tóxicos no ambiente, responsáveis pela poluição do solo, lençol freático, rios e lagos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Geral**

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de linhagens de leveduras como promotoras de crescimento vegetal, através da avaliação *in vitro* da produção de ácido indolacético e solubilização de fosfato, e da avaliação *in vivo* através da inoculação da linhagem com melhores resultados em mudas de tomate.

### **2.2. Específicos**

- Avaliar a produção de ácido indolacético por linhagens de leveduras;
- Avaliar a solubilização de fosfato por linhagens de leveduras;
- Selecionar a linhagem de levedura com melhores resultados;
- Avaliar a ação da inoculação desta linhagem no desenvolvimento de mudas de tomate, em casa de vegetação.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Micro-organismos edáficos, rizosféricos e epífitos

Os solos são constituídos por componentes bióticos e abióticos. Os componentes bióticos abrangem raízes de plantas, populações de micro-organismos e animais, enquanto que a porção não-viva do solo inclui água, matéria orgânica e fragmentos de rocha de tamanhos variados (VORONEY, 2007). O ambiente edáfico constitui o habitat natural da grande maioria dos micro-organismos, sendo considerado um ecossistema, devido a sua composição de frações orgânicas, inorgânicas e as espécies que nele habitam (GALLI, 1964).

Segundo Araújo & Hungria (1994), os componentes mais numerosos da fração biológica do solo são, sem dúvida, os micro-organismos, que desempenham um papel vital na construção do solo, como suporte físico para as culturas agrícolas. Pode-se considerar que os solos são depósitos de atividade microbiana, apesar de o espaço ocupado pelos micro-organismos vivos ser estimado em menos de 5% do espaço total. Portanto, a predominância de atividade microbiana é encontrada em “*hot spots*” ou focos, como por exemplo, agregados com matéria orgânica acumulada e a rizosfera (PINTON et al., 2001).

Apesar da microbiota do solo ocupar apenas uma pequena parte do solo, ela apresenta diversos tipos microbianos, e em quantidades elevadas, sendo representada por bactérias, arqueas, fungos, protozoários, vírus e invertebrados microscópicos (nematóides e ácaros) (MADIGAN et al., 2004), constituindo uma

enorme diversidade genética e desempenhando funções únicas e essenciais na manutenção dos agroecossistemas.

Os micro-organismos fazem parte do solo de maneira indissociável, sendo responsáveis por inúmeras reações bioquímicas relacionadas, não só com a transformação da matéria orgânica, mas também com o intemperismo das rochas, assim, desempenham papel fundamental na gênese do solo. Eles estão envolvidos em diversos processos de interesse agrônomo como a fixação biológica de nitrogênio (VITOUSEK et al., 2002), alteração da disponibilidade e toxicidade de metais às plantas (BURD et al., 2000), produção de fitormônios, solubilização de minerais do solo e ação antagônica aos fitopatógenos; todas essas funções possibilitam ao micro-organismo atuar na promoção de crescimento vegetal (GLICK, 1995). Além disso, podem atuar como reguladores de nutrientes, pela decomposição e re-síntese da matéria orgânica e ciclagem dos nutrientes, sendo, portanto, fonte e dreno de nutrientes para o crescimento das plantas (SILVEIRA & FREITAS, 2007).

A rizosfera foi definida no início do século XX, por Hiltner, como o volume de solo que recebe influência das raízes de plantas (HILTNER, 1904). Atualmente, é definida como “a região do solo que recebe influência direta das raízes, possibilitando proliferação microbiana” (SILVEIRA & FREITAS, 2007). A rizosfera é constituída por três unidades que interagem entre si: a planta, o solo e os micro-organismos (LYNCH, 1990). Possui características distintas do solo e é o local onde ocorre a maior parte das interações entre micro-organismos e plantas (PEREIRA, 2000). É neste ambiente que os micro-organismos atuam desenvolvendo processos biológicos.

Micro-organismos são os seres vivos dominantes no solo rizosférico, tanto em termos de biomassa, correspondendo a mais de 80% da biomassa total (excluindo raízes), quanto de atividade (respiração), e basicamente determinam o funcionamento do ecossistema edáfico (BRUINSMA et al., 2003). Esta intensa atividade microbiana se deve à secreção de compostos pelas raízes, denominados exsudatos, que são compostos por íons, enzimas, mucilagem e diversos outros metabólitos (BAIS et al., 2006). Estes exsudatos influenciam o crescimento de bactérias e fungos que colonizam a rizosfera e, em contrapartida, os micro-organismos influenciam a composição e a quantidade de vários componentes dos exsudatos radiculares (YANG & CROWLEY, 2000).

Latour et al. (1999), afirma que a diversidade e a estrutura dos microrganismos na rizosfera são influenciadas pelo tipo de planta e de solo. O tipo de solo parece ser o fator primário em determinar a composição das espécies microbianas e/ou sua função (RASCHE et al., 2006). A variação dos fatores físico-químicos e ambientais entre os diferentes tipos de solo interage de uma maneira complexa, influenciando a diversidade microbiana e sua função. Várias interações ecofisiológicas ocorrem no ambiente rizosférico, e o que se observa, como crescimento e produção vegetal, é resultado dessas interações, favorecendo ou prejudicando a plena expressão do potencial genético da planta (CARDOSO & FREITAS, 1992).

Os micro-organismos que habitam a rizosfera têm sido bastante estudados, pois neste habitat a atividade microbiana, a quantidade e o tipo de exsudatos são diferentes do solo não rizosférico, acarretando uma maior diversidade de populações de bactérias, fungos, protozoários e nematóides (AVILA, 2007). Nesta região, os fatores físico-químicos, como acidez, umidade e disponibilidade de nutrientes também diferem.

Micro-organismos também são encontrados associados às plantas, interagindo com elas e com outros micro-organismos (BONFANTE & ANCA, 2009). Micro-organismos endofíticos são encontrados no interior dos tecidos das plantas, sem com isso causar danos ao vegetal (SAIKKONEN et al., 2004); para que ocorra a colonização / invasão, as plantas liberam moléculas sinalizadoras, que são reconhecidas pelo micro-organismo, e este, por sua vez, se adere a superfície do vegetal, rompe barreiras de proteção e invade seus tecidos (DE BOER et al., 2005). A colonização pode ocorrer de forma passiva, quando a entrada é por meio de estômatos ou ferimentos, ou ativa, quando há produção de estruturas de fixação (SMITH & SMITH, 2011).

Micro-organismos epifíticos colonizam a superfície das plantas (SAIKKONEN et al., 2004); podem ser encontrados nas partes aéreas das plantas (folhas, caules, flores e frutos) ou nas raízes (LINDOW & BRANDL, 2003). A colonização da parte aérea apresenta fatores que podem dificultar o estabelecimento do micro-organismo, principalmente devido às variações das condições ambientais, como umidade e temperatura; para superar as adversidades eles se aproveitam de alguns mecanismos que auxiliam a colonização, como a fina camada de ar que cobre a superfície das folhas, que retém vapor de água dos estômatos (AXTELL & BEATTIE, 2002), a liberação de açúcares pelas lesões (LINDOW & BRANDL, 2003) e a

deposição de nutrientes exógenos, como o pólen (FOKKEMA et al., 1983). Existem também micro-organismos epifíticos que apresentam a capacidade de alterar a superfície dos vegetais, a fim de torná-lo favorável à sua colonização, como por exemplo, através da produção de tensoativos (HUTCHISON et al., 1995).

### **3.2. Micro-organismos Promotores de Crescimento Vegetal (MPCV)**

Várias estratégias podem ser empregadas para promover o crescimento das plantas; estas englobam técnicas de preparo do solo e manejo das florestas, melhoramento das plantas, através de cruzamentos entre as espécies, e utilização da engenharia genética (ROSSI, 2006). Outra interessante tecnologia que possibilita o desenvolvimento vegetal é a exploração de micro-organismos rizosféricos que são capazes de estimular o crescimento vegetal.

A promoção de crescimento proporcionada por micro-organismos pode ocorrer, principalmente, através da produção de hormônios vegetais, da disponibilização de nutrientes, da absorção e translocação de minerais, e do controle de patógenos (BOTTINI et al., 2004). O estímulo ao desenvolvimento vegetal pode ocorrer de forma direta ou indireta (GLICK, 1995); a promoção direta envolve a produção de compostos que nutrem ou facilitam a entrada de certos nutrientes para as plantas, como fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfatos e a produção de reguladores de crescimento vegetal; enquanto que o antagonismo contra patógenos é uma maneira indireta de estímulo (DI-FIORE & DEL-GALLO, 1995).

O nitrogênio é o elemento mais limitante para o desenvolvimento das plantas e embora esteja presente na atmosfera em grandes quantidades, é encontrado na forma molecular, não assimilável pelas plantas, sendo necessária a transformação em amônio (WILLIAMS & MILLER, 2001). Na natureza, este processo é realizado, principalmente, pelas bactérias fixadoras de nitrogênio, as chamadas diazotróficas, que são capazes de assimilar o nitrogênio atmosférico e converte-lo, tornando-o assimilável através da enzima nitrogenase (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006); em contrapartida as bactérias se beneficiam dos compostos ricos em carbono, que são exsudados pelas raízes.

O fósforo é um elemento limitante na maioria dos ecossistemas mesmo em solos em que há grandes reservas deste elemento no solo. Devido a sua alta reatividade com elementos como Al, Fe e Ca, ele se encontra na forma insolúvel e,

assim, indisponível às plantas (ROLIM NETO et al., 2004). Dentre as possíveis medidas para evitar a deficiência nutricional do fósforo está a utilização de processos microbiológicos para aperfeiçoar seu aproveitamento do solo (RODRIGUEZ & FRAGA, 1999). Segundo Khan et. al. (2007), micro-organismos da rizosfera solubilizam fosfato, convertendo-o de insolúvel em formas solúveis nos solos, e assim, tornando-o disponível às plantas. De acordo com Chen et. al. (2006), algumas bactérias são capazes de secretar ácidos orgânicos que facilitam o procedimento de conversão. Entre os gêneros capazes de solubilizar compostos de fosfato inorgânico estão: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Flavobacterium* e *Erwinia* (RODRIGUEZ & FRAGA, 1999).

Ambientes naturais tendem a estar em equilíbrio, entretanto a ação humana pode influenciar esse sistema. A utilização de químicos sintéticos, como fungicidas, é um método primário de controle de doenças, gerando desequilíbrio ambiental. Alternativo a isso aparece o controle biológico de patógenos, definido por Oliveira (2009) como controle natural de organismos, utilizando-se de outros organismos vivos, cuja premissa básica é manter a densidade populacional das espécies de pragas associadas à agricultura, em níveis econômicos e ecologicamente aceitáveis.

Para o agente de biocontrole ter competência na rizosfera é necessária a efetiva colonização da raiz, combinada com a habilidade de sobreviver e proliferar durante o crescimento das plantas por um período considerável de tempo, na presença de microbiota indígena (WHIPPS, 1997). Muitas espécies de plantas desenvolveram estratégias de defesa contra patógenos de solo, que envolvem o estímulo e a sustentação seletiva das populações de micro-organismos antagonistas na rizosfera (COOK et al., 1995), que agem de diversas maneiras para o controle biológico, entre elas, a competição por nutrientes e espaço, antibiose e produção de sideróforos.

A produção de fito-hormônios por micro-organismos, como auxinas, citocininas e giberilinas, é o mecanismo mais comum encontrado de promoção de crescimento vegetal (GRAY & SMITH, 2005), e desempenha um papel importante na promoção de crescimento vegetal (BERG, 2009). Os hormônios vegetais podem agir em diversos processos, como germinação, enraizamento e floração.

A giberilina pode ser encontrada em toda a planta, sendo sintetizada nos ápices caulinares, folhas em expansão e em frutos e sementes em desenvolvimento

(COLL et al., 2001). Na década de 30, uma doença causada por um fungo do gênero *Gibberella* foi descoberta em plantas de arroz, no Japão; em plantas jovens, estas se tornavam excessivamente altas devido a giberelina, liberada pelo fungo. Foram realizados estudos posteriores, que demonstraram que substâncias semelhantes às produzidas pelo fungo estão presentes em plantas, e estas são responsáveis por diversas funções (MALONEK et al., 2005).

As citocininas são relacionadas com a divisão e alongamento celular, promovendo efeitos fisiológicos sobre o crescimento e desenvolvimento de plantas (RAVEN et al., 2001); são produzidas nas raízes e transportadas pelo xilema, além de serem também produzidas em embriões e frutos (DEMASON, 2005).

As auxinas são produzidas nas regiões apicais e transportadas para outros locais das plantas, participando de seu crescimento e diferenciação (AWARD & CASTRO, 1983); entre seus efeitos estão o alongamento celular e o crescimento de frutos (RAVEN et al., 2001). Zakharova et al. (1999), afirmam que 80% das bactérias encontradas na rizosfera são capazes de produzir ácido indolacético, o representante mais comum das auxinas.

A utilização de micro-organismos promotores de crescimento vegetal pode gerar benefícios às plantas inoculadas, seja através do controle biológico de fitopatógenos, solubilização de minerais ou produção de hormônios vegetais.

### **3.3. Produção de auxinas por micro-organismos**

Muitos micro-organismos associados às plantas são capazes de produzir hormônios vegetais, como as auxinas, responsáveis pela extensão, divisão e diferenciação celular, capazes de estimular a germinação de sementes e tubérculos, promover a produção de xilema e formação de raízes, controlar processos de crescimento vegetativo, tropismo, florescência e frutificação das plantas e também podem afetar a fotossíntese, biossíntese de vários metabolitos e produção de fatores de resistência a estresses ambientais (ZHAO, 2010). Seu principal representante de ocorrência natural nas plantas é o ácido indolacético (TSAVKELOVA et al., 2006), que além de ser produzido por plantas, também é produzido por bactérias e fungos (BAREA et al., 1976; DVORNIKOVA et al., 1970). De acordo com Mirza et al. (2001), a produção por micro-organismos varia entre espécies e até entre estirpes de mesma espécie.

O principal efeito do ácido indolacético é promover o crescimento de raízes e caules, através do alongamento das células recém-formadas nos meristemas. É sintetizado, principalmente, em rotas bioquímicas dependentes do triptofano, embora alguns autores já tenham demonstrado algumas vias independentes deste aminoácido (LAST et al., 1991; NORMANLY et al., 1993).

A habilidade de sintetizar fitohormônios é amplamente distribuída entre bactérias associadas com plantas, sendo estas potencialmente utilizadas para a promoção do crescimento de muitas culturas. Bactérias endofíticas dos gêneros *Gluconacetobacter*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Curtobacterium*, *Pantoea*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas* podem promover o crescimento vegetal por meio da produção de fitohormônios (PATTEN & GLICK, 1996).

Na literatura diversos micro-organismos estão associados à produção de ácido indolacético, incluindo bactérias (KHALID et al, 2004; TSAVKELOVA et al., 2007; AHMAD et al., 2008; BHATTACHARYYA & JHA, 2012), leveduras (NASSAR et al., 2005; XIN et al., 2009; LIMTONG & KOOWADJANAKUL, 2012) e fungos filamentosos (RINCÓN et al., 2003; MAOR et al., 2004).

O AIA é sintetizado por micro-organismos através de diversas vias de biossíntese (ZHAO, 2010), sendo que a via melhor compreendida utiliza o triptofano, gerando como produto intermediário o indol-3-acetamida (CAMILLERI & JOUANIN, 1991).

Estudos demonstram que a levedura *Cyberlindnera (Williopsis) saturnus*, isolada da raiz de milho, produziu AIA *in vitro* e promoveu crescimento das raízes e dos brotos das plântulas quando inoculadas em sementes de milho (NASSAR et al., 2005). Outro trabalho identificou três isolados de leveduras endofíticas das espécies *Rhodotorula graminis* e *Rhodotorula mucilaginosa* que foram obtidas de caules de álamos do gênero *Populus*, como produtoras de auxinas *in vitro* (XIN et al., 2009).

Poder utilizar de micro-organismos produtores de AIA como inoculantes agrícolas é vantajoso em relação à utilização de fitohormônios sintéticos que possuem custos elevados (TSAVKELOVA et al., 2006).

### 3.4. Solubilização de fósforo por micro-organismos

O fósforo (P) é o segundo macronutriente mais requerido pelas plantas, atrás apenas do nitrogênio. Apesar de ser abundante em solos com cultivo agrícola, o fósforo é um elemento limitante do crescimento vegetal, devido a sua predominância na forma inorgânica insolúvel, associado com íons de alumínio, cálcio ou ferro, ou na sua forma orgânica (mais de 50%), que não são absorvidos pelas plantas (VAN RAIJ, 1991). Nos sistemas de produção agrícola são necessárias aplicações de fósforo inorgânico no solo para garantir a produtividade, porém cerca de 80% do total de fósforo aplicado no solo torna-se indisponível para as plantas, sendo este imobilizado, adsorvido nos hidróxidos de Fe e Al, precipitado com os elementos Fe, Al e Ca e/ou transformado em uma forma orgânica (REICHARDT & TIMM, 2004). Portanto os solos são, geralmente, deficientes em fósforo disponível às plantas.

Existem micro-organismos que apresentam capacidade de transformar este fósforo inorgânico insolúvel em uma forma solúvel e assim, disponibilizá-lo para as plantas (BERG, 2009), são os chamados micro-organismos solubilizadores de fosfato (GYANESHWAR et al., 2002).

Os micro-organismos solubilizadores de fosfato são responsáveis pela liberação de ácidos orgânicos, como o glucônico, cítrico, glutâmico, oxálico, láctico, fumárico, tartárico e succínico; esses ácidos são capazes de reduzir o pH do ambiente (BHATTACHARYYA & JHA, 2012) e atuar como doadores de prótons e agentes quelantes dos íons Ca, Al e Fe, favorecendo assim a solubilização de fosfato inorgânico do solo (RODRIGUEZ & FRAGA, 1999).

Príncipe et al. (2007) testaram 72 isolados de bactérias nativas do solo de salinas na Argentina quanto a habilidade em solubilizar fosfato inorgânico e obtiveram 26% dos isolados como solubilizadores de fosfato mineral. Chagas-Jr. et al. (2010) avaliaram 205 isolados de rizóbios de solos da Amazônia quanto a capacidade de solubilização de fosfato de cálcio em meio líquido e 56% dos isolados apresentaram bons resultados. Wang et al. (2012) estudaram duas bactérias, *Paenibacillus polymyxa* e *Paenibacillus macerans*, e observaram que elas aumentam a disponibilidade de fósforo no solo para as raízes das plantas.

Na literatura é possível encontrar trabalhos que demonstram solubilização de fósforo por bactérias do gênero *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*, *Erwinia* (RODRIGUEZ

& FRAGA, 1999), *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Bradyrhizobium*, *Brevibacterium*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Mycobacterium* e *Sarcina* (VAZQUEZ et al., 2000; STAMFORD et al., 2003; SOUCHIE et al., 2005; CHEN et al., 2006; ZHU et al., 2007; STAMFORD et al., 2009); fungos filamentosos dos gêneros *Trichoderma* (VINALE et al., 2008), *Absidia* (NENWANI et al., 2010), *Aspergillus* (SINGH & REDDY, 2011), *Penicillium* e *Rhizopus* (MITTAL et al., 2008); actinomicetes como *Micromonospora*, *Nocardia* e *Streptomyces* (MASON et al., 1990; HAMDALI et al., 2008; GHODHBANE-GTARI et al., 2010; GUPTA et al., 2010a); e leveduras dos gêneros *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Rhodotorula* e *Debaryomyces* (NARSIAN et al., 2010; HESHAM e MOHAMED, 2011), *Pichia* (KAUR & SATYANARAYANA, 2009) e *Candida* (TSANG, 2011).

A utilização de micro-organismos solubilizadores de fosfato vem sendo muito estudada, por ser uma alternativa ao uso excessivo de fertilizantes (SINGH et al., 2011).

### 3.5. Leveduras

Leveduras são organismos pertencentes ao domínio Eukaryota que apresentam características típicas de fungos, como presença de parede celular rígida, núcleo organizado com membrana nuclear, nutrição heterotrófica através de absorção de nutrientes, reprodução sexuada através de células especializadas denominadas esporos, ausência de pigmentos fotossintetizantes e de motilidade (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Segundo Bigaton (2010), as leveduras diferem dos fungos filamentosos por ser unicelulares, possuírem capacidade de se reproduzirem sexualmente, sem formação de um corpo de frutificação ou assexuadamente, por brotamento.

As leveduras são representadas por dois Filos, Ascomycota e Basidiomycota. As primeiras estão classificadas no subfilo *Saccharomycotina* e *Taphrinomycotina*, enquanto que as outras nos subfilos *Agaricomycotina* e *Pucciniomycotina* (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Na natureza as leveduras podem ser encontradas em folhas, frutos, grãos de cereais e outros substratos contendo açúcares, podendo também ser isoladas do ar, do solo, de água de lagos, rios e mares, da pele e do intestino de animais, incluindo associações com insetos (KURTZMAN & FELL, 1998).

As leveduras são utilizadas desde o começo da história da humanidade, na produção de pão, álcool etílico, vinho e cerveja, e atualmente outras funcionalidades também são atribuídas a elas. Podem participar do processo de tratamento de efluentes e resíduos, empregadas na biorremediação de áreas contaminadas; leveduras do gênero *Candida*, apresentam diversas espécies, algumas comercialmente viáveis, capazes de produzir lipase e degradarem lipídios (WACHÉ et al., 2006). Lange (1998) isolou leveduras dos gêneros *Candida*, *Debaryomyces* e *Rhodotorula*, de ambientes contaminados com bifenil e demonstrou que estes eram capazes de degradá-lo. Bastos et al. (2000) relatou que o fenol, composto tóxico proveniente de resíduos industriais, pode ser degradado pela espécie *Candida tropicalis*, isolada de solos Amazônicos.

Na agricultura, trabalhos indicam a aplicação das leveduras como agentes de controle biológico de patógenos, especialmente de frutos pós-colheita, sendo cada vez maior o número de espécies relacionadas (EL-TARABILY & SIVASITHAMPARAM, 2006; JANISIEWICZ et al., 2010).

Apesar das leveduras serem encontradas em menor quantidade na rizosfera das plantas, se comparadas às rizobactérias e fungos filamentosos, as que habitam o ambiente edáfico apresentam potencial para promover o crescimento vegetal. As principais ações diretas desses micro-organismos nas plantas estão na produção de fitormônios de crescimento (XIN et al., 2009), no auxílio à nutrição da planta, através da solubilização de minerais (ROSA-MAGRI et al., 2012), na produção de sideróforos (WANG & CHI, 2009) e no controle biológico de fitopatógenos (ROSA et al., 2010).

### **3.6. Leveduras rizosféricas promotoras de crescimento vegetal**

Os fungos podem contribuir substancialmente com a biomassa microbiana do solo (EKELUND et al., 2001), bem como com a diversidade genética dos micro-organismos do solo (FIERER et al., 2007) e dentre estes fungos, existem as leveduras. A distribuição das leveduras no solo foi recentemente revista por Botha (2006), que observou uma grande diversidade, como a *Saccharomyces cerevisiae* (SNIEGOWSKI et al., 2002), geralmente associada a fermentação de bebidas.

Na maioria dos casos, o número e a composição das espécies de leveduras são distribuídas de forma irregular no solo, entretanto já se sabe que são

principalmente encontradas no solo perto de frutos que caíram, uma vez que este fornece nutrientes para o inóculo de levedura (BOTHA, 2006), e na rizosfera das plantas (CLOETE et al., 2009). Há evidências de que ao longo dos anos, as leveduras podem exercer efeito positivo sobre a estrutura do solo, ciclagem de nutrientes e promover crescimento de plantas.

As leveduras podem contribuir com o processo de mineralização no solo, mesmo, em sua maioria, não sendo degradadoras primárias, porém são capazes de assimilar os produtos de degradação microbiana de materiais vegetais (BOTHA, 2011). Elas também participam dos níveis tróficos, sendo que a biomassa resultante de levedura pode, posteriormente, agir como fonte de nutrientes e energia para representantes de níveis tróficos superiores, como insetos e nematóides. Existem indícios de que algumas leveduras do solo podem também ser capazes de regular os números de nematóides através de um efeito antagonista sobre estes organismos (BOTHA, 2006).

Estudos indicam que leveduras encontradas na rizosfera podem contribuir, de maneira direta ou indireta, com o crescimento de raízes de plantas (MEDINA et al., 2004; NASSAR et al., 2005; EL-TARABILY & SIVASITHAMPARAM, 2006; CLOETE, et al., 2009). Indústrias desenvolveram condicionadores de solo com o objetivo de melhorar o desempenho das culturas, a partir de componentes minerais juntamente com leveduras dos gêneros *Candida*, *Saccharomyces*, e *Yarrowia* (HIGA, 1991; ITO & ITO, 2001). Também é possível encontrar adubos orgânicos constituídos de cepas de leveduras, além de componentes orgânicos e inorgânicos (PANG et al., 2003).

Leveduras dos gêneros *Cryptococcus* e *Lipomyces*, ajudam na manutenção da estrutura do solo, através da formação de agregados, por serem capazes de produzir compostos que se ligam as partículas do solo (VISHNIAC, 1995; BOTHA, 2006). Existem leveduras que atuam no processo de transformação de nutrientes. Alguns representantes dos gêneros *Candida*, *Geotrichum*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* e *Williopsis* são capazes de transformar amônio em nitrato *in vitro* (AL-FALIH, 2006). Enquanto que representantes dos gêneros *Candida*, *Geotrichum*, *Rhodotorula* e *Williopsis* foram capazes de solubilizar fosfato insolúvel *in vitro* (AL-FALIH, 2005).

Existem leveduras que interagem com fungos micorrízicos para fornecer à planta, fósforo e nitrogênio. Também se sabe que algumas leveduras exercem

diferentes níveis de aumento de colonização de raiz e crescimento de micorríza (GOLLNER et al., 2006).

As leveduras do solo também são capazes de aumentar diretamente o crescimento da planta, são as chamadas leveduras promotoras de crescimento em plantas, que inclui os gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Trichosporon*, *Williopsis* e *Yarrowia* (EL-TARABILY & SIVASITHAMPARAM, 2006; MEDINA et al., 2004; NASSAR et al., 2005; CLOETE et al., 2009).

O mecanismo utilizado pelas leveduras para promover o crescimento das plantas pode ser diferente. A levedura *Y. lipolytica* apresenta capacidade de solubilizar fosfato de rocha, aumentando a aquisição deste pela planta e melhorando o seu crescimento (MEDINA et al., 2004). A produção de reguladores de crescimento também é outra maneira de promover crescimento (EL-TARABILY & SIVASITHAMPARAM, 2006), e entre os compostos estão o ácido indolacético e as giberelinas, que são produzidos *in vitro* pelas leveduras (CLOETE et al., 2009).

Algumas leveduras do solo são antagonistas para agentes patogênicos fúngicos de raiz, como *Cephalosporium maydis* e *Rhizoctonia solani* (EL-MEHALAWY et al., 2004; EL-TARABILY, 2004). Estudos apontam que *Candida glabrata*, *Candida maltosa*, *Rhodotorula rubra* e *Trichosporon cutaneum* reduzem a incidência de murchidão tardia do milho causado por *C. maydis* (EL-MEHALAWY et al., 2004). Outras leveduras como *Candida valida*, *R. glutinis* e *Trichosporon asahii* foram capazes de proteger a beterraba contra *R. solani* durante os ensaios de estufa (EL-TARABILY, 2004).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Material Biológico

Foram avaliadas seis linhagens de levedura isoladas de rizosfera, colmo e folha de cana-de-açúcar (RB867515) e milho (DBK-390), identificados através de técnicas de biologia molecular, pela empresa Genotyping Biotecnologia Ltda, como sendo das seguintes espécies: *Torulaspora globosa* (linhagens 5S51 e 5S55); *Trichosporon asahii* (linhagens 4C06 e 3S44); *Rhodotorula mucilaginosa* (linhagem 2F32) e *Meyerozyma guilliermondii* (linhagem 3C98). O código da linhagem e local de origem estão apresentados na Tabela 1. Na Figura 1 são apresentadas as características da colônia das linhagens, em meio de cultura YEPD, e morfologia celular, em microscópio óptico comum (aumento de 400 x).

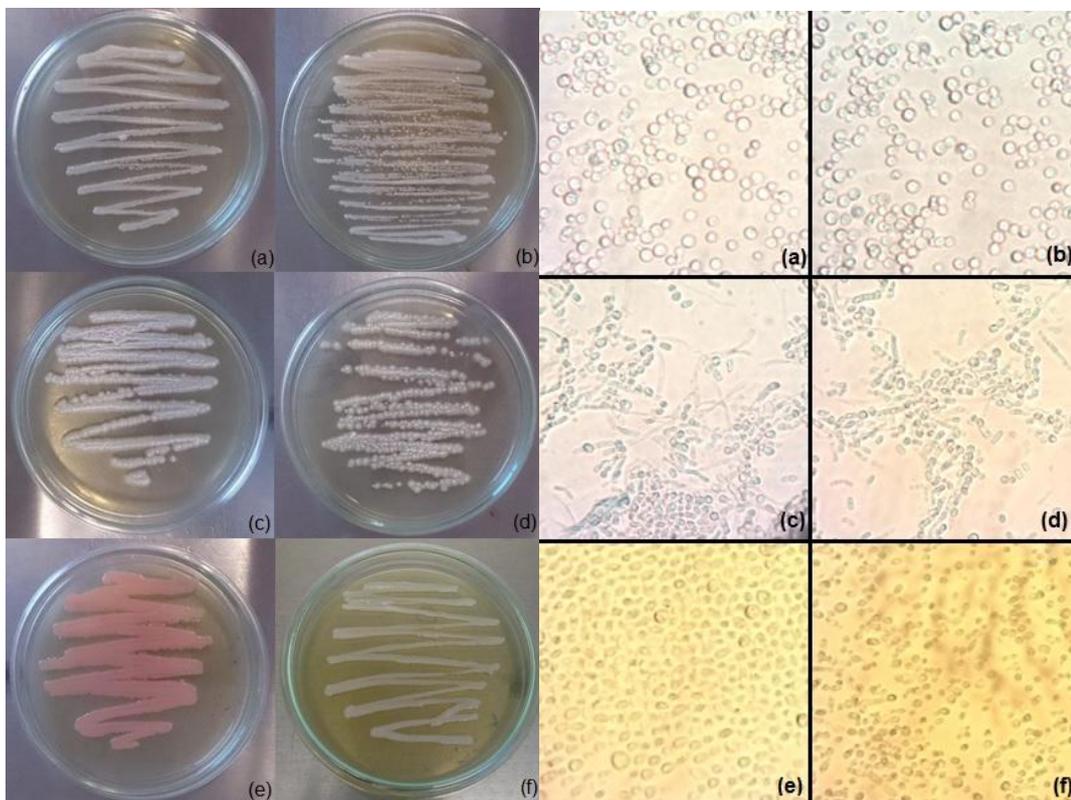
**Tabela 1** Origem dos isolados de levedura estudados.

Levedura	Linhagem	Origem
<i>Torulaspora globosa</i>	5S55	Rizosfera de cana-de-açúcar
<i>Torulaspora globosa</i>	5S51	Rizosfera de cana-de-açúcar
<i>Trichosporon asahii</i>	4C06	Colmo de cana-de-açúcar
<i>Trichosporon asahii</i>	3S44	Rizosfera de milho
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	2F32	Folha de cana-de-açúcar
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	3C98	Colmo de milho

Estes isolados foram avaliados, e se destacaram, em um processo de seleção com mais de 300 isolados, em relação ao controle biológico de fitopatógenos e, em um processo de *screening*, apresentaram capacidade de produção de ácido indolacético e/ou solubilização de fosfatos (ROSA, 2009).

Todas as leveduras utilizadas neste projeto pertencem ao banco de microorganismos do LAMAM (Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular), do Centro de Ciências Agrárias, *campus* de Araras-SP, onde o trabalho foi realizado.

Para o experimento com plantas de tomate, foram utilizadas sementes de tomate Santa Cruz Kada (Paulista), da empresa Isla, e mudas de tomate Santa Clara (tipo Santa Cruz), fornecidas pelo Viveiro de mudas das sementes Rio Pardo.



**Figura 1** Isolados das leveduras: (a) *T. globosa* (linhagem 5S51); (b) *T. globosa* (linhagem 5S55); (c) *T. asahii* (linhagem 4C06); (d) *T. asahii* (linhagem 3S44); (e) *Rh. mucilaginosa* (linhagem 2F32); (f) *M. guilliermondii* (linhagem 3C98).

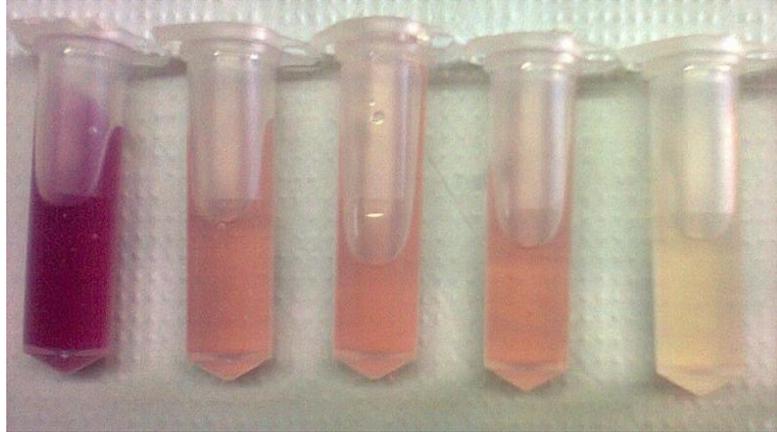
## **4.2. Produção de ácido indolacético (AIA)**

### *4.2.1. Seleção de linhagens de leveduras produtoras de AIA*

Para a avaliação da produção líquida de AIA pelos isolados de levedura, foi utilizada metodologia modificada de diMenna (1957). Frascos erlenmeyer (500 mL), cada um contendo 200 mL de meio de cultura Batata Dextrose (BD) (200 mL de caldo de batata e 20 g de dextrose por litro de meio) (pH não ajustado) estéril, foram complementados ou não com uma solução de triptofano a 5%, sendo este esterilizado por filtração com membrana Millipore de 0.22  $\mu\text{m}$  (KHALID et al. 2004). Os frascos foram inoculados com suspensão de células da levedura, ( $1 \times 10^7$  células), e mantidos em incubadora refrigerada com agitação, a 25°C, 160 rpm por 7 dias, com retirada de amostras para análise a cada 24 horas.

### *4.2.2. Avaliação da produção de AIA*

Para a quantificação de AIA produzido/degradado, a amostra foi centrifugada (3000 rpm por 3 minutos) e 1,5 mL do sobrenadante de cultivo foi pipetado em tubos teste com a adição de 1,5 mL do reagente de Salkowski (solução composta por cloreto de ferro 0,5 M e ácido perclórico 35%) (GORDON E WEBER, 1951). Os tubos contendo a mistura foram deixados para reagir por 30 minutos, a temperatura ambiente, para o desenvolvimento de coloração rosa, indicativo da presença de AIA. A intensidade da cor foi determinada por análise em espectrofotômetro em comprimento de onda 530 nm. Para a confecção de uma curva padrão, soluções com concentrações conhecidas de AIA foram preparadas, e avaliadas como descrito acima. Foram realizadas três repetições de cada tratamento.



**Figura 2** Coloração rosa indica a presença de AIA no meio, após reação com Reagente de Salkowski; quanto mais intensa a cor, maior a concentração de AIA na solução.

#### *4.2.3. Quantificação do crescimento de células de levedura*

Para a determinação do crescimento celular dos isolados de levedura, estes foram cultivados em meio de cultura Batata Dextrose (BD) (200 mL de caldo de batata e 20 g de dextrose por litro de meio) (pH não ajustado) estéril, complementados ou não com uma solução de triptofano a 5%, sendo este esterilizado por filtração com membrana Millipore de 0.22  $\mu\text{m}$  (KHALID et al. 2004). Os frascos foram inoculados com suspensão de células da levedura, ( $1 \times 10^7$  células), e mantidos em incubadora refrigerada com agitação, a 25°C, 160 rpm por 7 dias, com retirada de amostras a cada 24 horas. A contagem celular foi realizada através de microscopia em Câmara de Neubauer, pela densidade óptica da suspensão celular e os resultados expressos em células/mL.

### **4.3. Solubilização de fosfato**

#### *4.3.1. Seleção de linhagens de leveduras com potencial de solubilização de fosfato inorgânico em meio de cultura sólido*

Para selecionar as leveduras capazes de solubilizar fosfato, foi utilizada a metodologia de solubilização em meio sólido com formação de halo translúcido ao redor da colônia (YARROW, 1998). Em placas de Petri, contendo meio de cultura

Pikovskaya sólido (0,5 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de dextrose, 0,5 g/L de sulfato de amônio, 0,2 g/L de cloreto de potássio, 0,1 g/L de sulfato de magnésio, 0,0001 g/L de sulfato de manganês, 0,0001 g/L sulfato de ferro, 18 g/L de ágar) com 5 g/L de fosfato tricálcico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) como fonte de fosfato insolúvel, foi inoculado, de forma pontual, no centro da placa, a levedura a ser avaliada. Em seguida as placas foram incubadas a 25°C durante 3 dias. O meio de cultura, originalmente fosco devido à presença de fosfato insolúvel, apresenta halo translúcido ao redor da colônia da levedura capaz de solubilizar o fósforo. As leveduras que apresentaram halo foram selecionadas para a próxima etapa de avaliação de solubilização de fosfato em meio de cultura líquido.

#### *4.3.2. Solubilização de fosfato tricálcico em meio de cultura líquido*

Para quantificação da solubilização de fosfato tricálcico pelas leveduras selecionadas foi realizado um experimento em meio líquido. Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio de cultura Pikovskaya líquido (0,5 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de dextrose, 0,5 g/L de sulfato de amônio, 0,2 g/L de cloreto de potássio, 0,1 g/L de sulfato de magnésio, 0,0001 g/L de sulfato de manganês, 0,0001 g/L sulfato de ferro) complementados ou não com fosfato tricálcico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) como fonte de fosfato insolúvel (pH não ajustado) foi inoculado ou não com as leveduras de acordo com os tratamentos.

O experimento foi realizado com amostras sacrifícios em triplicatas, com 3 tratamentos (T1: levedura + meio + fosfato, T2: meio + fosfato, e T3: meio + levedura). Os frascos dos tratamentos com levedura foram inoculados com uma suspensão de  $1 \times 10^7$  células. Os tratamentos com adição de fosfato receberam 5 g de fosfato tricálcico por litro de meio de cultura. Os frascos foram incubados por 12 dias a 25°C, e 160 rpm, com análises realizadas a cada 3 dias. Foi avaliado o pH através do aparelho digital pHmetro, sendo que este foi calibrado com as soluções padrão de pH 4 e 7 antes da leitura. A quantificação de fosfato solúvel do meio de cultura foi realizada de acordo com a metodologia de Strickland & Parson (1960), através do método colorimétrico do azul de molibdênio, onde foi adicionado 1mL do reagente (30g/L de molibdato de amônio, 15,55% de ácido sulfúrico, 54g/L de ácido ascórbico e 1,36g/L de tartarato de antimônio de potássio) e 9mL da amostra. A mistura reagiu por 15 minutos, a temperatura ambiente para desenvolver a

coloração azul; através desta técnica, com a reação do fosfato solúvel e a alteração de cor da amostra é possível calcular a quantidade de fosfato solúvel dissolvido na substância utilizando o espectrofotômetro de UV/visível em um comprimento de onda de 880 nm. Para obtenção dos resultados foi realizada uma curva padrão, utilizando dez concentrações conhecidas de fosfato solúvel.



**Figura 3** Análise de fosfato solúvel pela técnica colorimétrica de azul de molibidênio; quanto mais intensa a cor, maior a concentração de fósforo solubilizado.

#### **4.4. Avaliação do desenvolvimento de plantas de tomate inoculadas com a levedura *T. globosa* (5S55)**

A partir dos resultados obtidos nos experimentos de produção de AIA e solubilização de fosfato *in vitro*, a levedura *T. globosa* (5S55), com melhores resultados, foi selecionada para ser avaliada em plantas de tomate.

Este experimento visou verificar o potencial total da levedura *T. globosa* (5S55) em promover crescimento de plantas de tomate em seus diversos mecanismos de promoção de crescimento vegetal.

As mudas de tomate, após 30 dias da emergência, foram transferidas para sacos plásticos próprios para o cultivo, com capacidade para 5 litros, contendo substrato comercial adubado.

Para a produção do inóculo, foi realizado o cultivo da levedura em meio líquido YEPD (extrato de levedura, peptona, dextrose) em shaker a 160 rpm, 30°C, por 3 dias. A contagem de células foi realizada em Câmara de Neubauer. A suspensão de células foi centrifugada e ressuspensa com solução salina (NaCl 0,85%); foram preparadas diferentes suspensões, de acordo com o tratamento, variando concentração celular, presença e ausência de glicose (20 g/L) e triptofano (5%), sendo considerados 13 tratamentos (Tabela 2). A inoculação das plantas foi realizada com a pipetagem de 60 mL da suspensão próximo à raiz da muda de tomate, após seu transplante para os sacos com substrato.

As plantas permaneceram em casa de vegetação por 45 dias. Foram realizadas regas diárias até atingir a capacidade de campo e estacamento para evitar tombamento das plantas. Após a coleta, foi determinada altura de planta e comprimento de raiz em centímetros (cm) e matéria seca da parte aérea e raiz. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com oito repetições para cada tratamento.

**Tabela 2** Definição dos tratamentos utilizados no experimento em casa de vegetação.

Tratamento	Concentração de células	Triptofano (5%)	Glicose (20 g/L)
T1	$1 \times 10^8$ células.ml <sup>-1</sup>	Ausente	Presente
T2	$1 \times 10^8$ células.ml <sup>-1</sup>	Presente	Ausente
T3	$1 \times 10^8$ células.ml <sup>-1</sup>	Presente	Presente
T4	$1 \times 10^8$ células.ml <sup>-1</sup>	Ausente	Ausente
T5	$3 \times 10^8$ células.ml <sup>-1</sup>	Ausente	Presente
T6	$3 \times 10^8$ células.ml <sup>-1</sup>	Presente	Ausente
T7	$3 \times 10^8$ células.ml <sup>-1</sup>	Presente	Presente
T8	$3 \times 10^8$ células.ml <sup>-1</sup>	Ausente	Ausente
T9	$9 \times 10^8$ células.ml <sup>-1</sup>	Ausente	Presente
T10	$9 \times 10^8$ células.ml <sup>-1</sup>	Presente	Ausente
T11	$9 \times 10^8$ células.ml <sup>-1</sup>	Presente	Presente
T12	$9 \times 10^8$ células.ml <sup>-1</sup>	Ausente	Ausente
T13	Sem Inóculo	Ausente	Ausente

**Figura 4** Plantas de tomate inoculadas ou não com a levedura *T. globosa* (5S55), em experimento em casa de vegetação.

#### **4.5. Análise estatística**

As análises estatísticas dos resultados foram realizadas com o auxílio do programa estatístico ACTION STAT, utilizando Análise de Variância (ANOVA) e comparação das médias pelo teste de Tukey ou Scott-Knott a 5% de significância para ensaios *in vitro* e 10% de significância para ensaios *in vivo*.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Produção de ácido indolacético (AIA) pelos isolados de levedura, em testes *in vitro*

Os resultados mostram que as leveduras produzem e consomem o AIA no meio de cultura, no decorrer do período de avaliação (168 horas); considerando esse dado, são apresentados resultados da produção líquida de AIA (Tabela 3).

**Tabela 3** Produção líquida média (ao longo de 7 dias) de AIA pelas linhagens de levedura, na presença e ausência de triptofano, em experimento *in vitro*.

Linhagens	Presença de Triptofano	Produção de AIA $\mu\text{g.ml}^{-1}$
<i>T. asahii</i> (3S44)	Com	0 c
	Sem	0 c
<i>M. guilliermondii</i> (3C98)	Com	0 c
	Sem	0 c
<i>T. asahii</i> (4C06)	Com	0 c
	Sem	0 c
<i>T. globosa</i> (5S51)	Com	219,7 b
	Sem	0 c
<i>Rh. mucilaginosa</i> (2F32)	Com	242,1 ab
	Sem	0 c
<i>T. globosa</i> (5S55)	Com	377,9 a
	Sem	0 c

\* Letras diferentes indicam que há diferença significativa entre as médias, pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

Os resultados mostram que, nas condições avaliadas, os dois isolados de *Trichosporon asahii* e o isolado de *Meyerozyma guilliermondii*, não apresentaram produção de AIA em meio de cultura BD, suplementado ou não com triptofano, a 25°C, 160 rpm, pH 6,0. Apesar deste resultado, as mesmas linhagens produziram AIA em outros ensaios, sendo observado que a alteração do pH inicial do meio de 6,0 para 4,5 foi capaz de promover um aumento drástico na produção de AIA, de quase nulo para próximo a 30 µg/mL; o mesmo foi observado quando foi realizada a mudança da fonte de carbono no meio de cultura, sendo que a troca de dextrose por sacarose foi capaz de estimular a produção, principalmente para as linhagens de *T. asahii* (dados não publicados).

Há relatos na literatura de resultados de produção de AIA por linhagens de *M. guilliermondii* e *T. asahii* em outras condições de cultivo. Limtong & Koowadjanakul (2012) verificaram que o isolado de *M. guilliermondii* (LM120) cultivado em meio de cultura YEPD (extrato de levedura, peptona, dextrose) e complementado com triptofano, produziu 68,1 µg/mL de AIA após 7 dias de cultivo. Nakayan (2013) e Nutaratat (2014) também observaram produção de AIA pelos isolados de *M. guilliermondii* (CC1 e DMKU-RP168) nas mesmas condições anteriores, produzindo em média 10,6 µg/mL de AIA em 5 dias de cultivo e 4,5 µg/mL de AIA após 7 dias de cultivo, respectivamente. El-Tarabily (2004) obteve uma produção de 31,7 µg/mL por um isolado de *Trichosporon asahii*.

A produção de AIA pelas leveduras, neste trabalho, foi avaliada na presença e ausência de triptofano. Os resultados apresentados na Tabela 1 mostram que nenhuma das leveduras produziu AIA na ausência de triptofano, demonstrando assim a necessidade deste aminoácido como precursor para a síntese do AIA.

Trabalhos indicam que na ausência de triptofano isolados de *M. guilliermondii*, *Rh. mucilaginoso* e *M. caribbica* apresentaram valores de produção de 3 µg/mL de AIA (NAKAYAN et al., 2013). Dos 24 isolados de levedura, testadas por Nassar et al. (2005), quanto a produção de AIA, na presença e ausência de triptofano, todas obtiveram produção apenas na presença do aminoácido.

O triptofano é o principal precursor da síntese de AIA, sendo, na maioria dos casos, necessário para a produção. Na presença de triptofano, existem, pelo menos, cinco diferentes rotas metabólicas descritas para a síntese de AIA e a maioria delas são semelhantes aos descritos em plantas (PATTEN & GLICK, 1996; SPAEPEN et al., 2007a). Um único micro-organismo pode seguir diversas rotas para a produção

de AIA, sendo necessários vários métodos genéticos e bioquímicos para a identificação dos percursos utilizados pelo micro-organismo (SPAEPEN & VANDERLEYDEN, 2015). Outras condições também são necessárias para a biossíntese de AIA, além da presença de triptofano, como vitaminas, sais, oxigênio, pH adequado, temperatura, fonte de carbono e nitrogênio (APINE & JADHAV, 2011).

Os dois isolados de *Torulaspota globosa* e o isolado de *Rhodotorula mucilaginosa*, avaliados neste trabalho, apresentaram alta produção de AIA, sendo que para a levedura *T. globosa* (linhagem 5S55) a produção líquida média foi de 377,9 µg/mL, resultado estatisticamente superior à outra linhagem de *T. globosa* (5S51) e estatisticamente igual ao isolado de *Rhodotorula mucilaginosa* (2F32). Os valores encontrados neste estudo são considerados elevados, quando comparados a trabalhos encontrados na literatura, sendo estes os maiores valores encontrados até o momento para a produção de AIA por micro-organismos (EL-TARABILY, 2004; NASSAR et al., 2005; XIN et al., 2009; BILKAY et al., 2010; AMPRAYAN, 2012; XINXIAN et al., 2011; LIMTONG & KOOWADJANAKUL, 2012; NAKAYAN, 2013; NUTARATAT, 2014; SUN, 2014).

É possível encontrar trabalhos na literatura que demonstram produção de AIA pelas espécies de levedura estudadas; Xin et al. (2009) encontrou produções de AIA próximas a 10 µg/mL e 20 µg/mL, ao final de 7 dias de cultivo em meio YEPD complementado com triptofano, pela levedura *Rh. mucilaginosa* (PTD3 e PTD2, respectivamente) isoladas de árvores do gênero *Populus*; Nutaratat (2014) relatou produção de 4,9 µg/mL de AIA, nas mesmas condições anteriores, pelo isolado de *T. globosa* (DMKU-RP31). Nakayan (2013) obteve produção média de 8,9 µg/mL de AIA após 5 dias de cultivo em meio de cultura YEPD complementado com triptofano, pelo isolado de *Rh. mucilaginosa* (CC2).

Outras espécies de levedura também foram estudadas e resultados de produção de AIA podem ser observados na literatura; isolados de *Candida valida*, *Rhodotorula glutinis* e *Trichosporon asahii*, produtores de AIA (29,5; 24,1; e 31,7 µg/mL respectivamente) e giberelina (6,2; 4,5; e 7,7 µg/mL respectivamente), demonstraram capacidade de atuar como promotores de crescimento e controle biológico de fitopatógenos em beterraba, em experimentos em casa de vegetação (EL-TARABILY, 2004).

O isolado *Lindera (Williopsis) saturnus*, endofítico de raiz de milho, cultivado em meio de cultura GP (Glicose e Peptona), produziu *in vitro*, ao final de 7 dias de

cultivo, 22,5 µg/mL de AIA, e foi capaz de promover o crescimento de raízes e parte aérea de milho sob condições gnotobióticas (cultura pura) (NASSAR et al., 2005); o isolado de *Rh. graminis*, cultivado em meio de cultura YEPD complementado com triptofano, produziu, aproximadamente, 40 µg/mL ao final de 7 dias de cultivo (XIN et al., 2009). Pequenas quantidades de AIA foram produzidas pelo isolado de *Candida tropicalis* HY, chegando a apenas 2,6 µg/mL (AMPRAYAN, 2012), enquanto que o isolado *Candida maltosa* (LM114), obtido de macaúba, chegou a produzir, após 7 dias de incubação, 314,3 µg/mL de AIA (LIMTONG & KOOWADJANAKUL, 2012). A levedura *Aureobasidium pullulans*, isolada de planta carnívora *Drosera indica* L., foi cultivada por 7 dias em meio de cultura YEPD, complementado ou não com triptofano, e obteve alta produção, chegando a 147,4 µg/mL de AIA na presença de triptofano ao final do período de incubação (SUN, 2014).

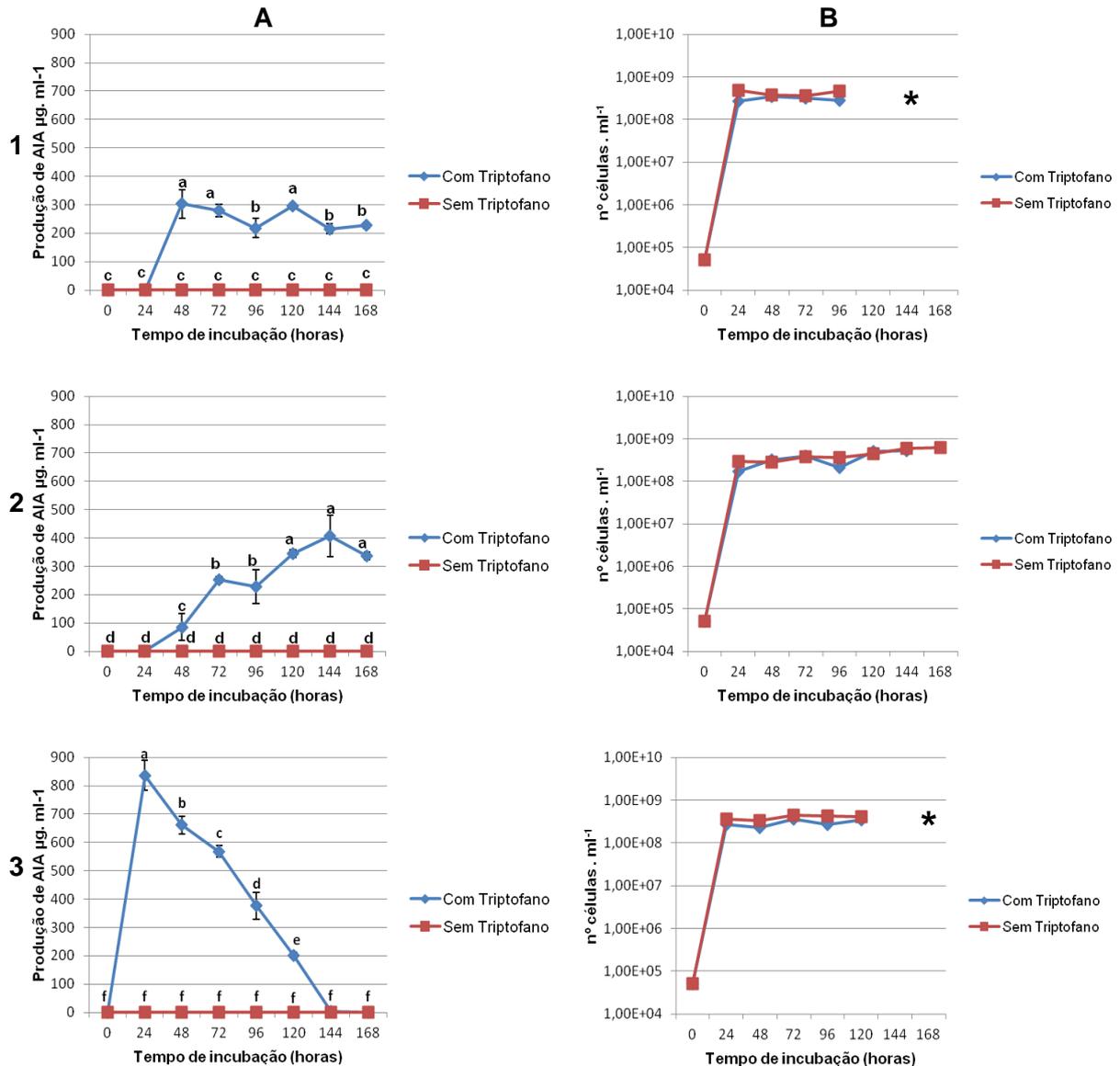
Outros grupos microbianos apresentam produção relativamente alta de AIA, descritos na literatura; Bilkay et al. (2010) cultivaram o fungo filamentosso *Aspergillus niger* em meio de cultura sintético Czapek-Dox, complementado com triptofano, por 15 dias e observaram o máximo de produção ao sexto dia de incubação, chegando ao valor de 132,7 µg/mL de AIA; o isolado de actinomiceto *Streptomyces* sp. (CMU-H009) foi cultivado em meio de cultura YM (extrato de levedura e extrato de malte), complementado com triptofano, e ao final de 7 dias de incubação produziu 143,95 µg/mL de AIA (KHAMNA et al., 2010); o isolado de bactéria *Pseudomonas fluorescens* (VI8R2) chegou a produzir 51,2 µg/mL de AIA após 2 dias de incubação (XINXIAN et al., 2011).

Na Figura 5 estão apresentados os resultados de produção de AIA no decorrer do tempo. A levedura *T. globosa*, linhagem 5S51 apresentou um máximo de produção após 48 horas de incubação, chegando a produzir 302,6 µg/mL de AIA. Após este período houve oscilação de produção, sendo que, provavelmente, este tenha sido consumido pela própria levedura. A levedura *Rh. mucilaginoso* também apresentou produção de AIA, na presença de triptofano, sendo o seu pico de produção após 144 horas de incubação, com uma produção de 406,9 µg/mL, sendo que logo após este período houve declínio da produção.

A linhagem 5S55 de *T. globosa* foi a que apresentou o maior pico de produção de AIA na presença de triptofano, chegando a aproximadamente 835 µg/mL, após 24 horas de incubação, logo após este período, porém, a produção apresentou queda. Esta linhagem teve comportamento distinto das outras, sendo que

apresentou máxima produção em 24 horas de cultivo, momento este que, para as outras linhagens, a produção ainda não havia sido iniciada.

A queda da quantidade de AIA no meio de cultivo pode ser explicada pelo consumo deste pela levedura, como fonte de nitrogênio. Na literatura existem relatos de que muitos micro-organismos possuem a capacidade de produzir AIA e alguns também podem degradá-lo (FAURE et al., 2009; SCOTT et al., 2013; ZÚÑIGA et al., 2013). A degradação de AIA por micro-organismos pode ser uma forma de sobrevivência, pois quando em excesso, pode se tornar tóxico às células, devido à acidificação do citoplasma (TROMAS & PERROT-RECHENMANN, 2010), além de ser uma forma de proteger as plantas, quando a concentração de AIA atinge um nível elevado, que é tóxico aos vegetais (BISWAS et al., 2000).



**Figura 5** Produção líquida de AIA (A) e Crescimento celular (B) das leveduras *T. globosa* (5S51) (1), *Rh. mucilaginoso* (2F32) (2) e *T. globosa* (5S55) (3); teste Scott-Knott a 5% de significância.

\* Dados não obtidos devido à floculação da levedura.

Como todos os fitormônios, o AIA estimula o crescimento vegetal apenas dentro de uma faixa de concentração (BISWAS et al., 2000) sendo ineficaz quando abaixo, e tóxica, quando acima. Ahmad et al. (2005) estudou isolados de *Azotobacter* que produziam AIA e constatou aumento no alongamento radicular das plântulas de *Sesbania aculeata* e *Vigna radiata* em concentrações entre 4,4 µg/mL e 24,8 µg/mL de AIA para a primeira planta e valores entre 4,4 µg/mL e 14,4 µg/mL de AIA para a segunda. Apesar disso, Barazani & Friedman (1999), constatou que

concentrações em torno de 13,5 µg/mL de AIA, produzidos por rizobactérias, provocaram efeito deletério para plântulas de alface; sendo a concentração de 3 µg/mL de AIA benéfico à plântula.

Esse efeito prejudicial às plantas ocorre quando a concentração de AIA está fora de um ótimo para a espécie, sendo que as auxinas, em geral, quando em excesso, apresentam ação herbicida (FARGASOVA, 1994). Porém, a produção de AIA pelos micro-organismos está diretamente ligada à disponibilidade de exsudatos radiculares (MELO, 1998). A produção e concentração de triptofano variam nos exsudatos das raízes de acordo com as espécies de plantas (PATTEN & GLICK, 1996). Observando a Figura 3 é possível notar que, a ausência do triptofano não interfere no crescimento celular de nenhuma das leveduras testadas, influenciando apenas a produção de AIA.

A levedura *T. globosa* (5S51) apresentou seu máximo de produção de AIA na fase estacionária de crescimento celular, o que também ocorreu com a levedura *Rh. mucilaginosa*. A levedura *T. globosa* (5S55) teve seu máximo de produção na fase log (crescimento exponencial), sendo que na fase estacionária sua produção entrou em declínio.

As linhagens de *T. globosa* apresentaram floculação celular, sendo que para a linhagem 5S51 isso ocorreu após 120 horas de incubação e, para a linhagem 5S55, após 144 horas (Figura 5). Por este motivo, a determinação do número das células foi impossibilitada. Por se tratar de meio de cultura puro, com apenas um isolado de levedura, o que ocorreu foi uma autofloculação (ESSER & KUES, 1983). Diversos fatores estão envolvidos na floculação celular, como: fatores genéticos, no qual a agregação das células é expressa por múltiplos genes alélicos, conhecidos como Locus FLO, que na presença de pelo menos um gene ativo, o fenótipo já é expresso e assim inicia a floculação (MIKI et al., 1982a); fatores fisiológicos, como a idade das células podem causar a floculação; fatores ambientais, como pH e temperatura (LUDWIG et al., 2001); e a concentração de cálcio, que é um elemento determinante na floculação (CALLEJA, 1974). As células permanecem ligadas via ponte de hidrogênio, formadas entre os grupos carboxila das células adjacentes, por meio de cálcio, determinando assim a adesão celular (STEWART et al., 1975). Este fenômeno também pode estar relacionado com o início da fase estacionária (SILVA, 2010).

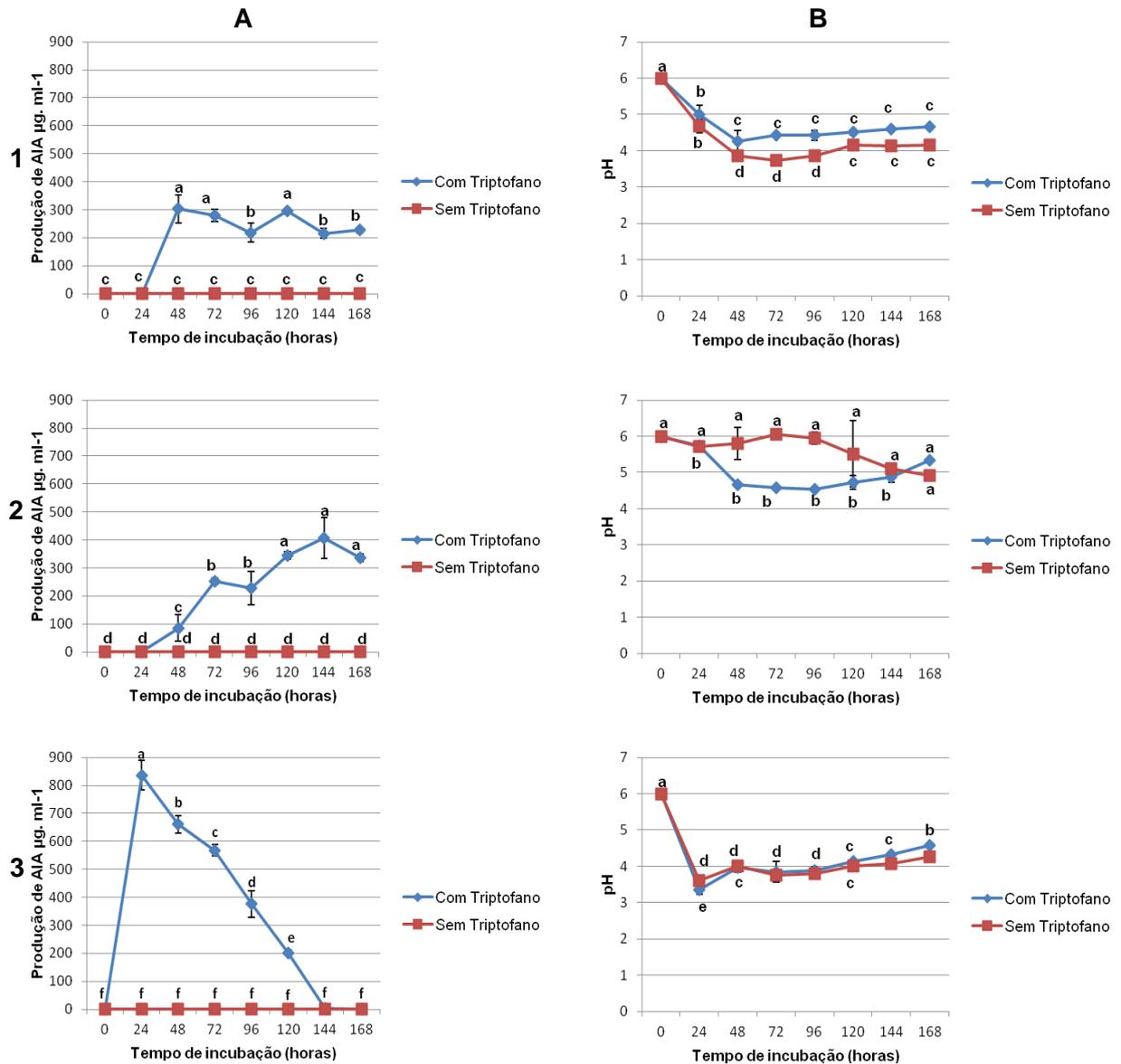
Outra explicação para o fenômeno da floculação é a toxicidade de AIA para a levedura, quando em níveis elevados. Scherr & Weave (1953) observaram que a adição do fitormônio pode causar dimorfismo em fungos, no caso da levedura, gera alteração em sua forma. Uma das leveduras analisadas por Shimosaka et al. (1991) apresentou floculação de células em meio líquido com AIA.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que não há relação entre o pH do meio de cultura e a produção de AIA (Figura 6). Apesar da levedura *T. globosa* (5S55) ter produzido a maior quantidade de AIA e causado a maior queda de pH no meio (Tabela 4), esta relação não acontece com as outras duas leveduras que produziram AIA. Enquanto que a levedura *Rh. mucilaginosa* obteve um valor de produção de AIA maior que o da levedura *T. globosa* (5S51), a queda do pH foi menor, indicando não haver relação direta entre pH e produção de AIA, para as linhagens testadas.

**Tabela 4** pH médio do meio de cultura BD com cultivo da levedura.

Linhagens	pH
<i>T. globosa</i> (5S51)	4,32 b*
<i>Rh. mucilaginosa</i> (2F32)	5,25 a
<i>T. globosa</i> (5S55)	3,97 c

\* Letras diferentes indicam que há diferença significativa entre as médias, pelo teste de Tukey ao nível de 5%.



**Figura 6** Produção de AIA (A) e Valores de pH no meio (B) para *T. globosa* (5S51) (1), *Rh. mucilaginoso* (2F32) (2) e *T. globosa* (5S55) (3); teste Scott-Knott a 5% de significância.

Estudos relacionados a pH relatam que a produção de hormônios promotores de crescimento em plantas, como as auxinas, é favorecida sob condições alcalinas (TOYOMASU et al., 1993; SANDBERG et al., 1993), diferente do que foi mostrado neste estudo. Entretanto não é possível afirmar que a produção de AIA é favorecida em condições ácidas de meio, pois para este estudo foi utilizada apenas três isolados de levedura, necessitando mais estudos para confirmar esse fato.

## 5.2. Solubilização de Fosfato

### 5.2.1. Seleção de linhagens de leveduras com potencial de solubilização de fosfato inorgânico em meio de cultura sólido

Todas as leveduras foram testadas quanto à capacidade de solubilização de fosfato inorgânico, em meio de cultura sólido. Observando a Figura 7, é possível notar a presença de halo de solubilização ao redor das colônias das linhagens da espécie *T. globosa*. A região translúcida em torno das colônias indica solubilização de fosfato pelas leveduras, sendo estas selecionadas para o teste de solubilização de fosfato inorgânico em meio líquido.



**Figura 7** Formação de halo de solubilização de fosfato inorgânico pelos dois isolados de levedura *Torulaspota globosa*.

O isolado de *Meyerozyma guilliermondii* também foi selecionado para o teste de solubilização no meio líquido devido a trabalhos prévios que demonstraram que, esta levedura causa queda do pH do meio de cultura, devido a produção de ácidos orgânicos, sendo este um possível mecanismo para solubilização de fosfato (dados não publicados). Além disto, na literatura é possível encontrar relatos de que outros

isolados de *M. guilliermondii* apresentam capacidade de solubilização (NAKAYAN, 2013).

A levedura *M. guilliermondii* (CC1), demonstrou capacidade de solubilização de fosfato inorgânico em ensaios em meio de cultura sólido e líquido (NAKAYAN et al., 2013), além de apresentar redução do pH do meio de cultura ao mesmo tempo em que ocorreu a solubilização de fosfato. Esta redução pode estar associada à produção de ácidos orgânicos ou liberação de íons H<sup>+</sup> (ARCAND & SCHNEIDER, 2006). Mendes et al. (2013) afirmam que devido a diversidade de ácidos produzidos pelos micro-organismos, o método de análise qualitativa da solubilização de fosfato inorgânico em placa pode ser falho. O não aparecimento de halo de solubilização pode ser atribuído as diferenças de taxas de difusão no meio de cultura ou diferenças nas propriedades de acidificação (JOHRI et al., 1999).

#### 5.2.2. *Quantificação da solubilização de fosfato tricálcico pelos isolados de levedura, em meio de cultura líquido*

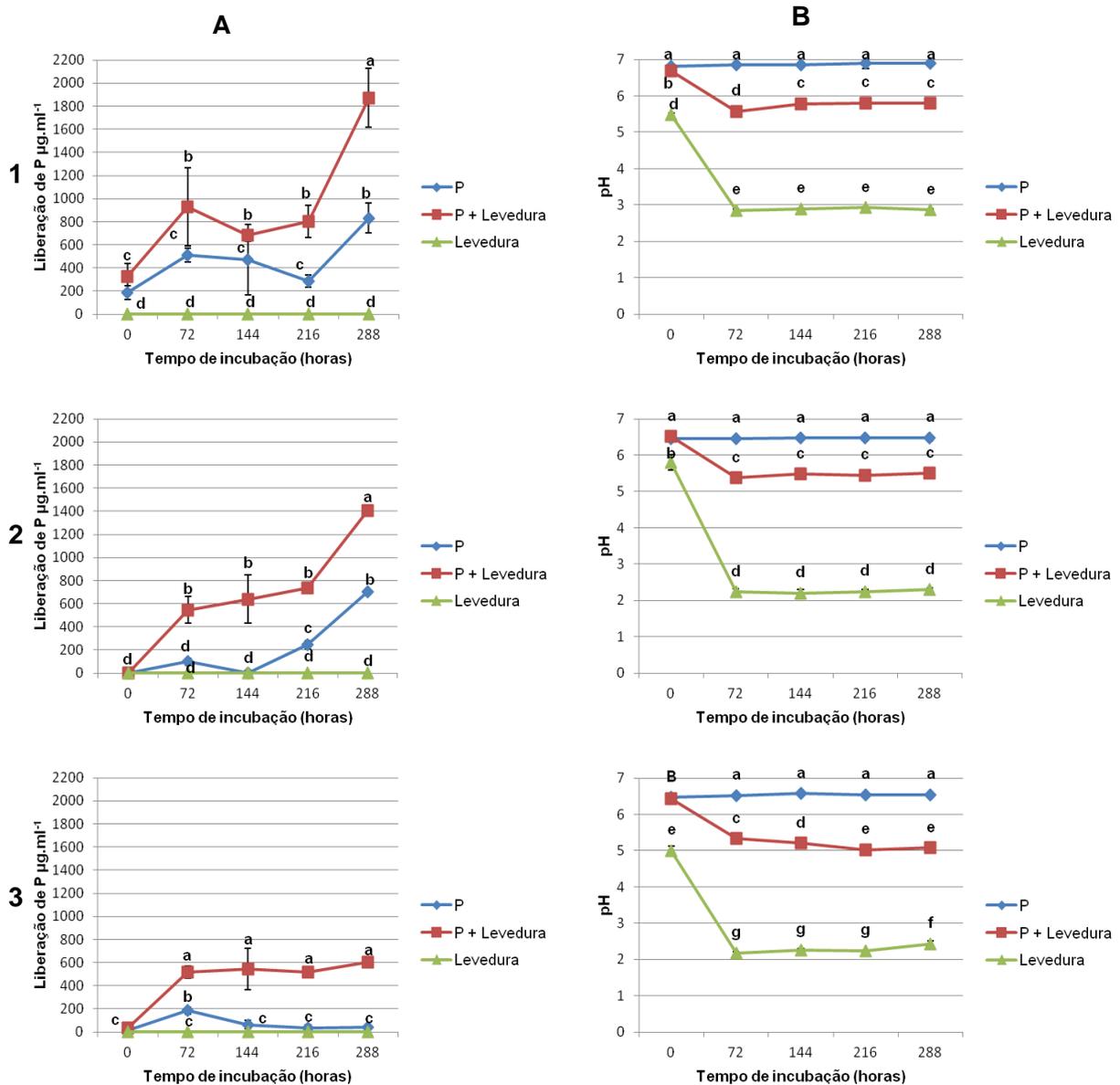
As três leveduras previamente selecionadas foram testadas quanto ao potencial de solubilizar fosfato em meio de cultura líquido, e os valores quantificados através do método colorimétrico de azul de molibdênio, cujo resultado pode ser observado na Tabela 5. Os três isolados testados solubilizaram fosfato em meio líquido Pikovskaya, nas condições testadas. O isolado 5S55 de *T. globosa* apresentou resultado estatisticamente maior que o isolado de *M. guilliermondii* (3C98) e estatisticamente igual ao outro isolado de *T. globosa* (5S51). A linhagem 5S51 de *T. globosa* apresentou resultado estatisticamente igual à levedura *M. guilliermondii* (3C98).

**Tabela 5** Médias do fósforo solubilizado pelas linhagens de levedura, em experimento *in vitro* através de método colorimétrico de azul de molibdênio.

<b>Linhagens</b>	<b>Fósforo solubilizado (<math>\mu\text{g.ml}^{-1}</math>)</b>
<i>M. guilliermondii</i> (3C98)	441,8 b
<i>T. globosa</i> (5S51)	664,7 ab
<i>T. globosa</i> (5S55)	922,1 a

\*Letras diferentes indicam que há diferença significativa entre as médias, pelo Teste de Tukey ao nível de 5%.

Os gráficos da Figura 8 mostram a solubilização de fósforo no tempo pelas três leveduras testadas e a oscilação do pH do meio de cultura Pikovskaya.



**Figura 8** Fósforo solúvel (A) e pH (B) para as leveduras *T. globosa* (5S55) (1), *T. globosa* (5S51) (2) e *M. guilliermondii* (3C98) (3); teste Scott-Knott a 5% de significância.

Para todas elas, a solubilização foi crescente, sendo que a levedura *T. globosa*, linhagem 5S55 conseguiu solubilizar 1872,8 µg/mL de fósforo em 288 horas. A levedura *T. globosa*, linhagem 5S51, solubilizou 1403,3 µg/mL de fósforo solúvel, também em 288 horas. Resultado inferior de solubilização foi observado pela

levedura *M. guilliermondii*, a qual chegou a solubilizar 601,7 µg/mL de fósforo solúvel no mesmo período.

Na literatura existem relatos destas leveduras como solubilizadoras de fosfato. A levedura *M. guilliermondii* CC1, estudada por Nakayan (2013), mostrou a maior capacidade de solubilização de fosfato em meio líquido, alcançando um valor de 190,8 µg/mL, seguido da levedura *M. caribbica* CC3 (170,4 µg/mL) e *Rh. mucilaginoso* (97,7 µg/mL) após 7 dias de cultivo. Al-Falih (2005) observou que as espécies *Candida tropicalis*, *Geotrichum capitatum* e *Rhodotorula rubra* solubilizaram fosfato de cálcio no meio de cultura; dentre as leveduras testada, o maior valor de solubilização foi alcançado pela levedura *G. capitatum*, atingindo uma solubilização de 45 µg/mL, seguido pela levedura *R. rubra* com 38 µg/mL ao final do período de 4 semanas de incubação; as leveduras *Geotrichum candidum* e *Rhodotorula minuta* apresentaram um valor baixo de solubilização, chegando a apenas 2 µg/mL e 4 µg/mL, respectivamente, ao final do período de incubação (AL-FALIH, 2005).

A levedura *Rhodotorula* sp. PS4, isolada da rizosfera da planta Espinheira marinha da região do Himalaia indiano, promoveu crescimento em tomate. O potencial de solubilização de fósforo inorgânico desta levedura atingiu concentrações de 261,3 e 278,3 µg/mL em pH neutro e temperatura entre 28 e 30°C, quando cultivada em meio Pikovskaya, complementado com fosfato tricálcico, como fonte de fosfato insolúvel, por 5 dias (MUNDRA, 2011).

Mohamed & Metwally (2014) obtiveram valores baixos de solubilização, sendo o melhor valor obtido pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* (2,4 µg/mL) após um período de 5 dias. Na literatura outros gêneros de levedura já foram relatados como solubilizadores de fosfato inorgânico, como *Barnettozyma (Williopsis) californica* (FALIH & WAINWRIGHT, 1995); *Saccharomyces*, *Klockera* e *Debaryomyces* (NARSIAN et al., 2010); *S. cerevisiae* (HESHAM & MOHAMED, 2011); *Candida tropicalis* (AMPRAYAN et al., 2012); e *Candida rugosa*, *Saccharomyces rouxii* (XIAO et al., 2013).

Foi observado, neste trabalho, que os tratamentos compostos apenas pela levedura, apresentaram brusca queda dos valores de pH; no tratamento composto pela levedura e o fósforo insolúvel também houve queda do pH, porém menor. O tratamento que continha apenas fósforo insolúvel não apresentou oscilações consideráveis.

O tratamento composto apenas pela levedura apresenta queda drástica do pH devido a liberação de ácidos orgânicos e, apesar de testes não terem sido feitos para o diagnóstico de quais ácidos são produzidos, pelo odor, acredita-se que dentre eles, o ácido acético esteja presente. O tratamento composto pela levedura e o fósforo insolúvel apresentou menor queda do pH devido a liberação de cálcio no meio de cultura.

A solubilização de fósforo inorgânico por micro-organismos através da produção de ácidos orgânicos vem sendo bastante estudado (WHITELAW, 2000; CHEN et al., 2006; KHAN et al., 2007). Chen et al. (2006) relata a produção de ácidos orgânicos como o ácido cítrico, ácido glucônico, ácido succínico, ácido láctico e ácido propiônico por *Bacillus megaterium*, *Rhodococcus erythropolis*, *Arthrobacter* sp., *Arthrobacter ureafaciens*, *Serratia marcescens*, *Delftia* sp., *Chryseobacterium* sp., *Phyllobacterium myrsinacearum* e *Gordonia* sp.

Neste trabalho, a levedura *Meyerozyma guilliermondii* foi a que apresentou o menor valor de pH (Figura 8), chegando a 2,17 em 72 horas de incubação. Chen et al. (2006) utilizando meio de cultura NBRIP para isolar bactérias solubilizadoras de fosfato e quantificar a solubilização, obtiveram valores de pH entre 4,90 e 6,00. O isolado 5S55 da levedura *T. globosa* foi o que apresentou maior valor de pH (Tabela 6) e maior valor de solubilização de fosfato (Tabela 5). Isto ocorreu, pois conforme a levedura foi solubilizando o fosfato inorgânico, foi também liberando íons cálcio no meio (liberados do fosfato tricálcico), que possibilitava o equilíbrio do pH, com a neutralização das cargas.

**Tabela 6** Valores médios de pH do meio de cultura Pikovskaya com cultivo da levedura.

<b>Linhagens</b>	<b>pH</b>
<i>M. guilliermondii</i> (3C98)	4,91 c*
<i>T. globosa</i> (5S51)	5,02 b
<i>T. globosa</i> (5S55)	5,39 a

\*Letras diferentes indicam que há diferença significativa entre as médias, pelo Teste de Tukey ao nível de 5%.

### **5.3. Desenvolvimento de mudas de tomate inoculadas com a levedura *T. globosa* (5S55)**

A Tabela 7 apresenta as médias dos valores de altura da parte aérea e do comprimento da raiz das plantas de tomate após 45 dias de cultivo. Em relação à altura de planta, o tratamento composto apenas pela levedura na maior concentração ( $9 \times 10^8$  células/mL) foi estatisticamente superior à testemunha (sem inóculo), apresentando melhor desenvolvimento; o mesmo foi observado para o mesmo tratamento (composto apenas pela levedura na maior concentração -  $9 \times 10^8$  células/mL) em relação a comprimento de raiz.

A Tabela 8 apresenta a influência da levedura nos parâmetros altura de planta e comprimento de raiz; observa-se que a presença da levedura foi fundamental tanto para altura de planta, quanto para comprimento de raiz, sendo que sua inoculação foi fundamental para a promoção de crescimento vegetal.

**Tabela 7** Valores médios de altura de planta (cm) e comprimento de raiz (cm) dos tomates, mantidos em casa de vegetação por 45 dias.

Tratamento	Parte aérea (cm)	Raíz (cm)
1x10 <sup>8**</sup>	46,87 ab	22,75 ab *
1x10 <sup>8</sup> T	45,00 ab	23,63 a
1x10 <sup>8</sup> G	42,37 ab	22,12 ab
1x10 <sup>8</sup> TG	43,00 ab	21,87 ab
3x10 <sup>8</sup>	41,75 ab	20,00 ab
3x10 <sup>8</sup> T	44,50 ab	20,62 ab
3x10 <sup>8</sup> G	40,75 ab	21,37 ab
3x10 <sup>8</sup> TG	46,62 ab	23,37 ab
9x10 <sup>8</sup>	49,12 a	23,87 a
9x10 <sup>8</sup> T	42,00 ab	24,12 a
9x10 <sup>8</sup> G	41,62 ab	20,50 ab
9x10 <sup>8</sup> TG	41,87 ab	25,37 a
<b>Sem Inóculo</b>	35,37 b	15,25 b

\* Letras diferentes indicam que há diferença significativa entre as médias, pelo Teste de Tukey ao nível de 10%.

\*\*1x10<sup>8</sup>, 3x10<sup>8</sup> e 9x10<sup>8</sup>= diferentes concentrações de células; T= com triptofano, G= com glicose, TG= com triptofano e glicose.

**Tabela 8** Influência da levedura *T. globosa* (5S55) na altura de plantas (cm) e comprimento de raiz (cm) de tomate, em experimento em casa de vegetação.

Células de levedura	Altura de Planta (cm)	Comprimento de raiz (cm)
Presente	45,92 a	22,47 a *
Ausente	35,38 b	15,25 b

\* Letras diferentes indicam que há diferença significativa entre as médias, pelo Teste de Tukey ao nível de 10%.

Observando a Tabela 9, é possível perceber que não houve diferença estatística entre as concentrações de levedura, tanto para altura de planta, quanto para comprimento de raiz, sendo que a inoculação da levedura foi o suficiente para promover crescimento vegetal, independente da concentração de células do inóculo.

**Tabela 9** Altura de planta (cm) e Comprimento de raiz (cm) nas diferentes concentrações de células da levedura *T. globosa* (5S55), em experimento em casa de vegetação.

Concentração de células de levedura	Altura de Planta (cm)	Comprimento de raiz (cm)
$1 \times 10^8$ **	44,31 a	22,60 a *
$3 \times 10^8$	43,66 a	21,34 a
$9 \times 10^8$	43,41 a	23,47 a
Sem Inóculo	35,38 b	15,25 b

\* Letras diferentes indicam que há diferença significativa entre as médias, pelo Teste de Tukey ao nível de 10%.

\*\* $1 \times 10^8$ ,  $3 \times 10^8$  e  $9 \times 10^8$  = diferentes concentrações de células.

O incremento no crescimento vegetal também foi observado por Nakayan et al. (2013), que obtiveram bons resultados de promoção de crescimento vegetal quando suas plantas foram inoculadas com leveduras; em seu estudo, três leveduras foram isoladas em Taiwan, sendo elas *M. guilliermondii* (CC1), *R. mucilaginosa* (CC2) e *M. caribbica* (CC3), as quais se mostraram competentes quanto a produção de AIA e a solubilização de P em testes *in vitro*, além de promover o crescimento de plantas de milho e alface em experimentos em casa de vegetação, e apresentou resultados satisfatórios para altura de planta e massa seca de milho em campo, quando comparada ao controle.

A Tabela 10 apresenta os valores médios de massa seca da parte aérea e massa seca da raiz das plantas de tomate. Não houve diferença estatística entre os valores de massa seca da parte aérea. Entretanto quando comparados apenas as concentrações da levedura com a testemunha (Tabela 13) dos dados de massa seca de parte aérea, é possível afirmar que a maior concentração ( $9 \times 10^8$  células/mL)

foi estatisticamente igual a concentração média de levedura ( $3 \times 10^8$  células/mL) e superior a menor concentração ( $1 \times 10^8$  células/mL) e da ausência de levedura (sem inóculo), sendo assim, a concentração de inóculo influencia na massa seca de parte aérea, sendo que apenas a concentração mais elevada conseguiu ser superior a testemunha.

**Tabela 10** Massa seca (g) da parte aérea (PA) e da raiz (R) dos tomates.

<b>Tratamento</b>	<b>Massa Seca - PA (g)</b>	<b>Massa Seca - R (g)</b>
$1 \times 10^{8**}$	0,57 a	0,21 b *
$1 \times 10^8$ T	0,72 a	0,22 b
$1 \times 10^8$ G	0,49 a	0,15 b
$1 \times 10^8$ TG	0,57 a	0,39 ab
$3 \times 10^8$	0,63 a	0,20 b
$3 \times 10^8$ T	0,69 a	0,35 ab
$3 \times 10^8$ G	0,34 a	0,18 b
$3 \times 10^8$ TG	0,74 a	0,59 a
$9 \times 10^8$	0,92 a	0,28 b
$9 \times 10^8$ T	0,65 a	0,28 b
$9 \times 10^8$ G	0,59 a	0,39 ab
$9 \times 10^8$ TG	0,58 a	0,35 ab
<b>Sem Inóculo</b>	0,56 a	0,21 b

\* Letras diferentes indicam que há diferença significativa entre as médias, pelo Teste de Tukey ao nível de 10%.

\*\* $1 \times 10^8$ ,  $3 \times 10^8$  e  $9 \times 10^8$  = diferentes concentrações de células; T= com triptofano, G= com glicose, TG= com triptofano e glicose.

Houve diferença estatística entre os valores de massa seca de raiz. De acordo com a Tabela 10 é possível afirmar que apenas o tratamento com a concentração média de células de levedura e na presença de glicose e triptofano ( $3 \times 10^8$  células/mL TG) foi superior a testemunha (sem inóculo).

**Tabela 11** Massa seca (g) da parte aérea dos tomates, considerando apenas os tratamentos com levedura e a testemunha.

Tratamento	Massa Seca - PA (g)
$1 \times 10^8$	0,57 b
$3 \times 10^8$	0,63 ab
$9 \times 10^8$	0,92 a
Sem Inóculo	0,56 b

\* Letras diferentes indicam que há diferença significativa entre as médias, pelo Teste de Tukey ao nível de 10%.

A Tabela 12 mostra o efeito da glicose e do triptofano na massa seca de raiz. Os tratamentos que continham glicose e/ou triptofano foram estatisticamente superiores aos que não continham.

**Tabela 12** Efeito da glicose e do triptofano na massa seca (g) de raiz dos tomates, cultivados em casa de vegetação.

Tratamentos	Massa seca Raiz
Presença de Glicose	0,34 a *
Presença de Triptofano	0,36 a
Ausência de glicose e triptofano	0,23 b

\* Letras diferentes indicam que há diferença significativa entre as médias, pelo Teste de Tukey ao nível de 10%.

Esse resultado mostra a importância de se ter fonte de glicose e triptofano para as leveduras no estímulo no desenvolvimento radicular. A glicose é uma importante fonte de carbono para as leveduras, sendo ela preferencialmente utilizada, enquanto que os outros açúcares só serão metabolizados na ausência desta (DYNESEN et al., 1998); a superioridade em tratamentos que continham triptofano gerou incremento no crescimento de plantas, pois este pode ter sido

utilizado não apenas pela levedura *T. globosa* (5S55), mas também por micro-organismos indígenas produtores de AIA presente na micro-fauna do solo, para produção de AIA. A própria planta pode ter absorvido o triptofano e convertido-o em AIA através de suas enzimas (NASSAR et al., 2005). Este fato demonstra a importância da presença do triptofano no solo, tão necessário para a promoção do crescimento em plantas; e a necessidade da adição deste em inoculantes/fertilizantes biológicos.

Nassar et al. (2005) também observaram incremento na promoção de crescimento vegetal na presença de triptofano; durante o seu estudo a levedura *Williopsis saturnus* (isolado 4), endofítica de raízes de milho, foi selecionada entre 24 isolados devido a sua capacidade de produzir AIA *in vitro*. Para obter resultados de promoção de crescimento vegetal, testaram a levedura em plantas de milho em casa de vegetação e obtiveram bons resultados. Os tratamentos que continham a levedura *W. saturnus* (isolado 4), na presença e na ausência de triptofano, promoveram crescimento de plantas de milho, evidenciadas pelos parâmetros comprimento de raiz, altura de planta e massa seca de raiz e parte aérea. Estes resultados foram superiores quando comparados à testemunha e a aplicação da levedura *R. glutinis* (isolado 16), não produtora de AIA. Entretanto, o tratamento que continha a levedura *W. saturnus* (isolado 4) na presença de triptofano, foi estatisticamente superior à todos os outros tratamentos e testemunha em todos os parâmetros. Além disso, o tratamento que continha a levedura *R. glutinis* (isolado 16), não produtora de AIA, na presença de triptofano, foi estatisticamente superior ao tratamento que não o continha, demonstrando a possível presença de micro-organismos indígenas produtores de AIA utilizando do triptofano adicionado ao solo.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a realização deste estudo conclui-se que:

- Os dois isolados de *T. globosa* (5S51 e 5S55) e o isolado de *Rh. mucilaginosa* (2F32) produziram AIA na presença de triptofano, sendo o isolado de *T. globosa* (5S55) o mais eficiente na produção média do hormônio (377,9 µg/mL); esta levedura também apresentou o maior pico de produção de AIA (835 µg/mL), sendo este o maior valor encontrado na literatura até o momento;
- A ausência do triptofano não interferiu no crescimento celular de nenhuma das leveduras testadas, porém se apresentou fundamental para a produção de AIA;
- Os dois isolados de *T. globosa* (5S51 e 5S55) foram capazes de solubilizar fosfato através da formação de halo de solubilização em meio sólido; o isolado de *M. guilliermondii* (3C98) também foi selecionado como potencial solubilizador por causar a queda do pH do meio de cultura;
- Os dois isolados de *T. globosa* (5S51 e 5S55) e o isolado de *M. guilliermondii* (3C98) solubilizaram fosfato inorgânico em meio líquido, sendo o isolado de *T. globosa* (5S55) o que apresentou maior valor de solubilização (922,11 µg/mL); esta levedura também apresentou o maior pico de solubilização de fosfato (1872,77 µg/mL), sendo este o maior valor encontrado na literatura até o momento;
- O isolado de *T. globosa* (5S55) foi o que apresentou melhores resultados para produção de AIA e solubilização de fosfato neste estudo e na literatura

- A adição de triptofano e/ou glicose, à inoculação das mudas de tomate, favoreceu a ação da levedura em relação a massa seca de raiz.

## 7. LITERATURA CITADA

- AHEMAD, M.; KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. **Journal of King Saud University – Science**, v.26, p.1-20, 2014.
- AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M.S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. **Microbiological Research**, v.163, p.173-181, 2008.
- AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M. S. Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. **Turkish Journal of Biology**, Ankara, v.29, n.1, p.29-34, 2005.
- AL-FALIH, A. M. Nitrogen transformation in vitro by some soil yeasts. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.13, p.135-140, 2006.
- AL-FALIH, A. M. Phosphate solubilization in vitro by some soil yeasts. **Qatar University Science Journal**, v.25, p.119-125, 2005.
- AMPRAYAN, 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.
- APINE, O. A.; JADHAV, J. P. Optimization of medium for indole-3-acetic acid production using *Pantoea agglomerans* strain PVM. **Journal of Applied Microbiology**, v.110, p.1235-1244, 2011.

ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. Microrganismos de importância agrícola.

**Documentos 44 - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.** Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão, Centro Nacional de Pesquisa de Soja. 236 f. Brasília, 1994.

ARCAND, M.M.; SCHNEIDER, K.D. Plant and microbial based mechanisms to improve the agronomic effectiveness of phosphate rock: a review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.78, p.791-807, 2006.

AVILA, L. A. Efeitos do algodão Bt (Bollgard evento 531) na comunidade bacteriana da rizosfera . 90 f. **Dissertação (Mestrado)** - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2007.

AWARD, M.; CASTRO, P. R. C. Introdução à fisiologia vegetal. São Paulo: **Nobel**, 77 p., 1983.

AXTELL, C.A.; BEATTIE, G.A. Construction and Characterization of a proU-gfp Transcriptional Fusion That Measures Water Availability in a Microbial Habitat. **Applied And Environmental Microbiology**, v.68, p.4604–4612, 2002.

BAIS, H. P.; WEIR, T. L.; PERRY, L. G.; GILROY, S.; VIVANCO, J. M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual Review of Plant Biology**, v.57, p.233-266, 2006.

BARAZANI, O.; FRIEDMAN, J. Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria? **Journal of Chemical Ecology**, Dordrecht, v.25, n.10, p.2397-2406, 1999.

BAREA, J. M.; NAVARRO, E.; MONTOYA, E. Production of plant growth regulators by rhizospheric phosphate-solubilizing bacteria. **The Journal of Applied Bacteriology**, v.40, p.129-134, 1976.

BASTOS, A. E. R.; MOON, D. H.; ROSSI, A.; TREVORS, J. T.; TSAI, S. M. Salt-tolerant phenol-degrading microorganisms isolated from Amazonian soil samples. **Archives of Microbiology**, v.174, p.346-352, 2000.

BERG, G. Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.84, p.11-18, 2009.

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.28, p.1327–1350, 2012.

- BIGATON, A. D. Estruturas das comunidades e caracterizações metabólicas de leveduras em solos de Terra Preta Antropogênica. 102 f. **Dissertação (Mestrado)** - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2010.
- BILKAY, I. S.; KARAKOC, S.; AKSOZ, N. Indole-3- acetic acid and gibberellic acid production in *Aspergillus niger*. **Turkish Journal Biology**, v.34, p.313-318, 2010.
- BISWAS, J.C.; LADHA, J.K.; DAZZO, F.B.; YANNI, Y.G.; ROLFE, B.G. Rhizobia inoculation influences seedling vigor and yield of rice. **Agronomy Journal**, n.92, p.880-886, 2000.
- BONFANTE, P.; ANCA, I. A. Plants, Mycorrhizal Fungi and Bacteria: A Network of Interactions. **Annual Review Microbiology**, v.63, p.363-383, 2009.
- BOTHA, A. The importance and ecology of yeasts in soil. **Soil Biology & Biochemistry**, v.43, p.1-8, 2011.
- BOTHA, A. Yeast in soil. In: ROSA, C. A.; PETER, G. (Eds.), **The Yeast Handbook. Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts**, p.221-240, 2006.
- BOTTINI, R.; CASSÁN, F.; PICCOLI, P. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.65, p.497-503, 2004.
- BRUINSMA, M.; KOWALCHUK, G.A.; VAN VEEN, J.A. Effects of genetically modified plants on microbial communities and processes in soil. **Biology and Fertility of Soils**, v.37, p.329-337, 2003.
- BURD, G. I.; DIXON, D. G.; GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. **Canadian Journal of Microbiology**, v.46, p.237-245, 2000.
- CALLEJA, G.B. On the nature of the forces involved in the sex-directed flocculation of a fission yeast. **Canadian Journal of Microbiology**, v.20, p.797-803, 1974.
- CAMILLERI, C.; JOUANIN, L. The TR-DNA region carrying the auxin synthesis genes of the *Agrobacterium rhizogenes* agropine-type plasmid pRiA4: nucleotide sequence analysis and introduction into tobacco plants. **Molecular Plant-Microbe Interactions Journal**, v.4, p.155-162, 1991.
- CARDOSO, E. J. B. N.; FREITAS, S. S. A rizosfera. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M. & NEVES, M. C. P. (Eds.), **Microbiologia do solo**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p.41-57. 1992.

- CHAGAS-JÚNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, A. N. Caracterização fenotípica de rizóbios nativos isolados de solos da Amazônia e eficiência simbiótica em feijão caupi. **Acta Scientiarum, Agronomy**, v. 32, p.161-169, 2010.
- CHEN, Y. P.; REKHA, P. D.; ARUN, A. B.; SHEN, F. T.; LAY, 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. (Eds), **Plant hormones and their role in plant growth and development**, p.132–148, 1990.
- CLOETE, K. J.; VALENTINE, A. J.; STANDER, M. A.; BLOMERUS, L. M.; BOTHA, A. Evidence of symbiosis between the soil yeast *Cryptococcus laurentii* and a *Sclerophyllous medicinal* shrub, *Agathosma betulina* (Berg.) Pillans. **Microbial Ecology**, v.57, p.624-632, 2009.
- COLL, J. B.; RODRIGO, G. N.; GARCIA, B. S. TAMÉS, R. S. Citoquininas. In: COLL, J. B.; RODRIGO, G. N.; GARCIA, B. S. TAMÉS, R. S. **Fisiología Vegetal Madrid**: Ediciones Pirámide, p. 342-355. 2001.
- COOK, R.J.; THOMASHOW, L.S.; WELLER, D.M.; FUJIMOTO, D.; MAZZOLA, M.; BANGERA, G.; KIM, D.S. Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.92, p.4197-4201, 1995.
- DE BOER, W., FOLMAN, L.B., SUMMERBELL, R.C., BODDY, L. Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. **FEMS Microbiology Reviews**, v.29, p.795–811, 2005.
- DEMASON, D.A. Auxin-cytokinin and auxin-gibberellin interactions during morphogenesis of the compound leaves of pea (*Pisum sativum*). **Planta**, v.32, p.1432-2048, 2005.
- DI FIORE, S.; DEL GALLO, M. Endophytic bacteria: their possible role in the host plants. In: FENDRIK, I.; DEL GALLO, M.; VANDERLEYDEN, J.; DE ZAMAROCZY, M. **Azospirillum VI and related microorganisms**, p.169-187, 1995.
- DI MENNA, M.E. The isolation of yeasts from soil. **Journal of General Microbiology**, v.17, p.678–688, 1957.
- DINIZ, K.A.; OLIVEIRA, J. A.; GUIMARÃES, R. M.; CARVALHO, M. L. M.; MACHADO, J. C. Incorporação de microrganismos, aminoácidos,

- micronutrientes e reguladores de crescimento em sementes de alface pela técnica de peliculização. **Revista Brasileira de Sementes**, v.28, n.3, p.37-43, 2006.
- DVORNIKOVA, T. P.; SKRIABIN, G. K.; SUVOROV, N. N. Enzymatic transformation of tryptamine by fungi. **Mikrobiologiya**, v.39, p.42-46, 1970.
- DYNESEN, J.; SMITS, H. P.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. Carbon catabolite repression of the invertase during batch cultivations of *Saccharomyces cerevisiae*: the role of glucose, fructose and manose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, p. 579-582, 1998.
- EKELUND, F.; RONN, R.; CHRISTENSEN, S. Distribution with depth of protozoa, bacteria and fungi in soil profiles from three Danish forest sites. **Soil Biology and Biochemistry**, v.33, p.475-481, 2001.
- EL-MEHALAWY, A. A.; HASSANEIN, N. M.; KHATER, H. M.; KARAM EL-DIN, E. A.; YOUSSEF, Y. A. Influence of maize root colonization by the rhizosphere actinomycetes and yeast fungi on plant growth and on the biological control of late wilt disease. **International Journal of Agriculture and Biology**, v.6, p.599-605, 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, p.69–75, 2004.
- EL-TARABILY, K. A.; SIVASITHAMPARAM, K. Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. **Mycoscience**, v.47, p.25–35, 2006.
- ESSER, K.; KUES, U. Flocculation and its implication for biotechnology. **Process Biochemistry Journal**, v.18, p.21-23, 1983.
- 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.
- FARGASOVA, A. Comparative study of plant growth hormone (herbicide) toxicity in various biological subjects. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Zabrze, v.29, n.3, p.359-364, 1994.
- FAURE, D.; VEREECKE, D.; LEVEAU, J. H. J. Molecular communication in the rhizosphere. **Plant Soil**, v.321, p.279–303, 2009.

- FIERER, N.; BREITBART, M.; NULTON, J.; SALAMON, P.; LOZUPONE, C.; JONES, R.; ROBERSON, M.; EDWARDS, R. A.; FELTS, B.; RAYHAWK, S.; KNIGHT, R.; ROHWER, F.; JACKSON, R. B. Metagenomic and small-subunit rRNA analyses reveal the genetic diversity of bacteria, archaea, fungi, and viruses in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, p.7059-7066, 2007.
- FLOCH, G.; REY, P.; BENIZRI, E.; BENHAMOU, N.; TIRILLY, Y. Impact of auxin compounds produced by the antagonistic fungus *Pythium oligandrum* or the minor pathogen *Pythium* group F on plant growth. **Plant Soil**, v.257, p.459–470, 2003.
- FOKKEMA, N. J.; RIPHAGEN, I.; POOT, R. J.; DE JONG, C. Aphid honeydew, a potential stimulant of *Cochliobolus sativus* and *Septoria nodorum* and the competitive role of saprophytic mycoflora. **Transactions of British Mycological Society**, v.81, p.355–363, 1983.
- GALLI, F. Microrganismos do solo. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, v.21, p.248-252, 1964.
- GHODHBANE-GTARI, F.; ESSOUSSI, I.; CHATTAOUI, M.; CHOUAIA, B.; JAOUANI, A.; DAFFONCHIO, D.; BOUDABOUS, A.; GTARI, M. Isolation and characterization of non-Frankia actinobacteria from root nodules of *Alnus glutinosa*, *Casuarina glauca* and *Elaeagnus angustifolia*. **Symbiosis**, v.50, p.51-57, 2010.
- GLICK, B. R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v.41, p.109-117, 1995.
- GOLLNER, M. J.; PUSCHEL, D.; RYDLOVÁ, J.; VOSÁTKA, M. Effect of inoculation with soil yeasts on mycorrhizal symbiosis of maize. **Pedobiologia**, v.50, p.341-345, 2006.
- GORDON, S.A.; WEBER, R.P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**, v.26, p.192–195, 1951.
- GRAVEL, V.; ANTOUN, H.; TWEDDELL, R. J. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). **Soil Biology & Biochemistry**, v.39, p.1968-1977, 2007.
- GRAY, E. J.; SMITH, D. L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. **Soil Biology and Biochemistry**, v.37, p.395-412, 2005.

- GROOT, S. P. C.; KIELISZEWSKA-ROKICKA, B.; VERMEER, E.; KARSEN, C. M. Gibberellin induced hydrolysis of endosperm cell walls in gibberellins-deficient tomato seeds prior to radical protrusion. **Planta**, v.174, p. 500-504, 1988.
- GUPTA, N.; SAHOO, D.; BASAK, U.C. Evaluation of in vitro solubilization potential of phosphate solubilising *Streptomyces* isolated from phyllosphere of *Heritiera fomes* (mangrove). **African Journal of Microbiology Research**, v.4, p.136-142, 2010a.
- GYANESHWAR, P.; NARESHKUMAR, G.; PAREKH, L. J.; POOLE, P. S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, v.245, p.83–93, 2002.
- HAMDALI, H.; BOUIZGARNE, E.; HAFIDI, M.; LEBRIHI, A.; VIROLLE, M.J.; OUHDOUCH, Y. Screening for rock phosphate solubilizing Actinomycetes from Moroccan phosphate mines. **Applied Soil Ecology**, v.38, p.12-19, 2008.
- HESHAM, ABD EL-LATIF; MOHAMED, H. M. Molecular Genetic Identification of Yeast Strains Isolated from Egyptian Soils for Solubilization of Inorganic Phosphates and Growth Promotion of Corn Plants. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.21, p.55-61, 2011.
- HIGA, T. Soil conditioners. **United States Patent issued on January 15**, No. US 4,985,060, 1991.
- HILTNER, L. Über neue erfahrungen und probleme auf dem gebiete der bodenbakteriologie. **Arbeiten der Deutschen Landwirtschaft Gesellschaft**, v.98 p.59–78, 1904.
- HOYOS-CARVAJAL, L.; ORDUZ, S.; BISSETT, J. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. **Biological Control**, v.51, p.409-416, 2009.
- HUTCHISON, M. L.; TESTER, M. A.; GROSS, D. C. Role of biosurfactant and ion channel-forming activities of syringomycin in transmembrane ion flux: a model for the mechanism of action in the plant-pathogen interaction. **Molecular Plant-Microbe Interactions Journal**, v.8, p.610–620, 1995.
- ITO, E.; ITO, N. Soil conditioners and soil-ameliorating method. **United States Patent issued on August 21**, No. US 6,277,167 B1, 2001.
- JANISIEWICZ, W.; KURZTMAN, C. P.; BUYER, J. S. Yeast associated with nectarines and their potencial for biological controlo of brown rot. **Yeast**, 2010.

- JOHRI, J.K.; SURANGE, S.; NAUTIYAL, C.S. Occurrence of salt, pH and temperature-tolerant, phosphate-solubilizing bacteria in alkaline soils. **Current Microbiology**, v.39, p.89–93, 1999.
- AUR, P.; SATYANARAYANA, T. Improvement in cell-bound phytase activity of *Pichia anomala* by permeabilization and applicability of permeabilized cells in soymilk dephytinization. **Journal of Applied Microbiology**, v.108, p. 2041-2049, 2009.
- KHALID, A.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z.A. Screening plant growth promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. **Journal of Applied Microbiology**, v.96, p.473– 480, 2004.
- KHAMNA, S.; YOKOTA, A.; PEBERDY, J.F., LUMYONG, S. Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces* sp. isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils. **Journal of BioScience**, v.4, p.23-32, 2010.
- KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; WANI, P. A. Role of phosphate solubilizing microorganisms in sustainable agriculture. A review. **Agronomy Sustainable Development**, v.27, p.29-43, 2007.
- KORRES, A. M. N.; BUSS, D. S.; VENTURA, J. A.; FERNANDES, P. M. B. *Candida krusei* and *Kloeckera apis* inhibit the causal agent of pineapple fusariosis, *Fusarium guttiforme*. **Fungal Biology**, v.115, p.1251-1258, 2011.
- KURTZMAN, C. P.; FELL, J.W. The yeasts: a taxonomic study. **Elseviers Science**, 4ed., 1055p., 1998.
- LANGE, J.; HAMMER, E.; SPECHT, M.; FRANCKE, W.; SCHAUER, F. Biodegradation of biphenyl by the ascomycetous yeasts *Debaryomyces variijiae*. **Applied Microbiology and Biothecnology**, v.50, p.364-368, 1998.
- LAST, R.I.; BISSINGER, P.H.; MAHONEY, D.J.; RADWANSKI, E.R.; FINK, G.R. Tryptophan mutants in *Arabidopsis* – The consequences of duplicated tryptophan synthase  $\beta$  genes. **Plant Cell**, v.3, p. 345-358, 1991.
- LATOUR, X; PHILIPPOT, L.; CORBERAND, T.; LEMANCEAU, P. The establishment of an introduced community of fluorescent pseudomonads in the soil and in the rhizosphere is affected by the soil type. **FEMS Microbiology Ecology**, v.30, p.163–170, 1999.
- LIMTONG, S.; KAEWWICHIAN, R.; YONGMANITCHAI, W.; KAWASAKI, H. Diversity of culturable yeasts in phylloplane of sugarcane in Thailand and their capability to produce indole-3-acetic acid. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.30, p.1785-1796, 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.
- LINDOW, S.E.; BRANDL, M.T. Microbiology of the Phyllosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.1875–1883, 2003.
- LUDWIG, K. M.; OLIVA NETO, P.; ANGELIS, D. F. Quantificação da floculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.21, p.63-68, 2001.
- LYNCH, J. M. Introduction: some consequences of microbial competence for plant and soil. In: LYNCH, J. M. (Eds.) **The Rhizosphere**, John Wiley & Sons, Chichester, Reino Unido, p. 1–10, 1990.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia 10ed**, Pearson Education, São Paulo, 608p., 2004.
- MALONEK, S.; BOMKE, C.; BORNBERG-BAUER, E.; ROJAS, M. C.; HEDDEN. P.; HOPKINS, P.; TUDZYNSKI, B. Distribution of gibberellin biosynthetic genes and gibberellin production in the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Phytochemistry**, v.66, p.1296-1311, 2005.
- MAOR, R.; HASKIN, S.; LEVI-KEDMI, H.; SHARON, A. In planta production of indole-3-acetic acid by *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschnomene*. **Applied Environmental Microbiology**, v.70, p.1852–1854, 2004.
- MASON, J.C.; OLWEN, M.B.; BRODA, P. Preparation of IC-radiolabelled lignocelluloses from spring barley of differing maturities and their solubilization by *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces cyaneus*. **Journal of General Microbiology**, v.136, p.227- 232, 1990.
- 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**, v.56, p.449-456, 2004.
- MELO, I.S. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas: descrição e potencial de uso na agricultura. MELO, I.S; AZEVEDO, J.L. In: Ecologia microbiana - Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 488p., 1998.
- MENDES, G.O.; VASSILEV, N.B.; BONDUKI, V.H.A.; SILVA, I.R.; RIBEIRO JR., J.I.; COSTA, M.D. Inhibition of *Aspergillus niger* phosphate solubilization by fluoride

- released from rock phosphate. **Applied Environmental Microbiology**, v.79, p.4906-4913, 2013.
- MIKI, B. L. A.; POON, N. H.; JAMES, A. P.; SELIGY, V. L. Possible mechanism for flocculation interactions governed by gene *FLO1* in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, v.150, p.878-889, 1982a.
- MIRABAL ALONSO, 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.
- MIRZA, M. S.; AHMAD, W.; LATIF, F.; HAURAT, J.; BALLY, R.; NORMAND, P.; MALIK, K. A. Isolation, partial characterization, and the effect of plant growthpromoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane in vitro. **Plant and Soil**, v.237, p.47-54, 2001.
- MITTAL, V.; SINGH, O.; NAYYAR, H.; KAUR, J.; TEWARI, R. Stimulatory effect of phosphatesolubilizing fungal strains (*Aspergillus awamori* and *Penicillium citrinum*) on the yield. **Soil Biology and Biochemistry**, v.40, p.718-727, 2008.
- MOHAMED, H. M.; METWALLY, A. K. Effect of combined inoculation of *Rhizobium* with soil yeasts on nodulation, growth and yield of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under field condition. **American Journal of Plant Nutrition and Fertilization Technology**, v.4, p.1-10, 2014.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Editora UFLA, Lavras, 729 p., 2006.
- 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.; HUNG, M.; YOUNG, C. 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.
- NARSIAN, V.; SAMAHA, A. A. S. M.; PATEL, H. H. Rock phosphate dissolution by specific yeast. **Indian Journal of Microbiology**, v.50, p.57–62, 2010.

- NASSAR, A.; EL-TARABILY, K.; SIVASITHAMPARAM, K. Promotion of plant growth by a auxin-producing isolate of the yeast *Williopsis saturnus* endophytic in maize (*Zea mays* L.) roots. **Biology Fertility Soils**, v.42, p.97–108, 2005.
- NENWANI, V.; DOSHI, P.; SAHA, T.; RAJKUMAR, S. Isolation and characterization of a fungal isolate for phosphate solubilization and plant growth promoting activity. **Journal of Yeast and Fungal Research**, v.1, p.9-14, 2010.
- NORMANLY, J.; COHEN, J.D.; FINK, G.R. *Arabidopsis thaliana* auxotrophs reveal a tryptophan-independent biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid. **Proceedings of National Academy Sciences of the United States of America**, v.90, p.10355-10359, 1993.
- 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.
- OLIVEIRA, Z. M. Rizobactérias promotoras de crescimento vegetal isoladas de cana-de-açúcar sob fertilização orgânica e/ou convencional. 164 f. **Tese (Doutorado)** – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2009.
- OSORIO FILHO, B.D. Rizóbios eficientes em Lotus em condições de estresse hídrico e promotores de crescimento em arroz irrigado. 113 f. **Tese (Doutorado)** - Curso de Pós-graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2009.
- PALANIAPPAN, P.; CHAUHAN, P.S.; SARAVANAN, V.S.; ANANDHAM, R. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacterial isolates from root nodule of *Lepedeza* sp. **Biology Fertility Soils**, v.46, p.807-816, 2010.
- PANG, S. F., LUI, A., GOOLD, G.; CHU, A.; WONG, W.; LI, S., CHAN, E.; KWOK, I.; CHEUNG, L. NutriSmart: a fertiliser capable of re-establishing the sustainability of ecosystems and enhancing the productivity of farmland. **The regional institute online publishing**. Proceedings of the 11th Australian Agronomy Conference, 2003.
- PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, v.42, p.207–220, 1996.
- PEREIRA, J. C.; NEVES, M. C. P.; GAVA, C. A. T. Efeito do cultivo da soja na dinâmica da população bacteriana, em solos de cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, p.1183-1190, 2000.

- PINTON, R.; VARANINI, Z.; NANNIPIERI, P. The Rhizosphere: Biodiversity and Organic Substances at the Soil–Plant Interface, **Marcel Dekker**, 2001
- PLATANIA, C.; RESTUCCIA, C.; MUCCILLI, S.; CIRVILLERI, G. Efficacy of killer yeasts in the biological control of *Penicillium digitatum* on Tarocco orange fruits (*Citrus sinensis*). **Food Microbiology**, v.30, p.219-225, 2012.
- PRÍNCIPE, A.; ALVAREZ, F.; CASTRO, M. G.; ZACHI, L.; FISCHER, S. E.; MORI, G. B. JOFR, E. Biocontrol and PGPR features in native stains isolated from saline soils of Argentina. **Current Microbiology**, v.55, p.314-322, 2007.
- RASCHE, F.; HOLD, V.; POLL, C.; KANDELER, E.; GERZABEK, M. H.; VAN ELSAS, J. D.; SESSITSCH, A. Rhizosphere bacteria affected by transgenic potatoes with antibacterial activities compared to the effects of soil, wild-type potatoes, vegetation stage and pathogen exposure. **FEMS Microbiology Ecology**, v.56, p.219–235, 2006.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. Regulando o crescimento e o desenvolvimento: Os hormônios vegetais. In: RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**, 6. Ed., Guanabara Kogan S.A., p. 649 - 674, 2001.
- REICHARDT, K.; TIMM, L. C. Absorção de nutrientes pelas plantas. **Solo, planta e atmosfera: conceitos, processos e aplicações**, São Paulo, Ed. Manole, p. 341-362, 2004.
- RINCÓN, A.; PRIHA, O.; SOTTA, B.; BONNET, M. LE TACON, F. Comparative effects of auxin transport inhibitors on rhizogenesis and mycorrhizal establishment of spruce seedlings inoculated with *Laccaria bicolor*. **Tree Physiology**, v.23, p.785–791, 2003.
- RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnol**, v.17, p.319-339, 1999.
- ROLIM NETO, F. C.; SCHAEFER, C. E. G. R.; COSTA, L. M.; CORRÊA, M. M.; FERNANDES FILHO, E. I.; IBRAIMO, M. M. Adsorção de fósforo, superfície específica e atributos mineralógicos em solos desenvolvidos de rochas vulcânicas do Alto Paranaíba, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.28, p.953-964, 2004.
- ROSA, M. M. Avaliação de leveduras isoladas de áreas agrícolas como agentes no controle biológico de fitopatógenos. 121f. **Tese (Doutorado)** – Instituto de

- Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, 2009.
- ROSA, M. M.; TAU-K-TORNISIELO, S. M.; RAMPAZZO, P. E.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Evaluation of the biological control by yeast *Torulaspota globosa* against *Colletotrichum sublineolum* in sorghum. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.26, p.1491-1502, 2010.
- ROSA-MAGRI, M. M.; AVANSINI, S. H.; LOPES-ASSAD, M. L.; TAU-K-TORNISIELO, S. M.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Release of potassium from rock powder by the yeast *Torulaspota globosa*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.55, 2012.
- ROSSI, M. J. Tecnologia para produção de inoculantes de fungos ectomicorrízicos utilizando cultivo submerso em biorreator *airlift*. 188 f. **Tese (Doutorado)** – Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2006.
- SAIKKONEN, K.; WÄLI, P.; HELANDER, M., FAETH, S.H. Evolution of endophyte plant symbioses. **Trends Plant Science**, v.9, p.275–280, 2004.
- SANDBERG, G.; OSTIN, A.; EDLUND, F.; SITBON, B.; SANDBERG, O. Regulation of indole-3-acetic acid turnover in plants. **Plant and Plant cells Canterbury Meeting**, v.20, 1993.
- SANSONE, G.; REZZA, I.; CALVENTE, V.; BENUZZI, D.; TOSETTE, M. I. S. D. Control of Botrytis cinerea strains resistant to iprodione in apple with rhodotorulic acid and yeasts. **Postharvest Biology Technology**, v.35, p.245–251, 2005.
- SCHERR, G. H.; WEAVER, R. H. The dimorphism phenomenon on yeasts. **Bacteriological Reviews**, v.17, p.51-92, 1953.
- SCHLINDWEIN, G.; VARGAS, L.K.; LISBOA, B.B.; AZAMBUJA, A.C.; GRANADA, C.E.; GABIATTI, N.C.; PRATES, F.; STUMPF, R. Influência da inoculação de rizóbios sobre a germinação e o vigor de plântulas de alface. **Ciência Rural**, v.38, n.3, p.658-664, 2008.
- 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.
- SHIMOSAKA, M.; NOGAWA, M.; OHNO, Y.; OKAZAKI, M. Chitosanase from the plant pathogenic fungus, *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*. Purification and some

- properties. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.57, p.231-235, 1991.
- SILVA, L. A. F. Exigências nutricionais e operacionais para a produção e etanol pela levedura IQ-Ar/45-1 a partir do melaço em batelada alimentada. 91f.  
**Dissertação (Mestrado)** - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista. Araraquara, 2010.
- SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. Microbiota do solo e qualidade ambiental. **Instituto Agrônômico**, 312p., 2007.
- SINGH, H.; REDDY, M. S. Effect of inoculation with phosphate solubilizing fungus on growth and nutrient uptake of wheat and maize plants fertilized with rock phosphate in alkaline soils. **European Journal of Soil Biology**, v.47, p.30 – 34, 2011.
- SMITH, S.E.; SMITH, F.A., Roles of Arbuscular Mycorrhizas in Plant Nutrition and Growth: New Paradigms from Cellular to Ecosystem Scales. **Annual Review of Plant Biology**, v.62, p.227–50, 2011.
- SNIEGOWSKI, P. D.; DOMBROWSKI, P. G.; FINGERMAN, E. *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* coexist in a natural woodland site in North America and display different levels of reproductive isolation from European conspecifics. **FEMS Yeast Research** 1, P299-306, 2002.
- SOUCHIE, E.L.; AZCÓN, R.; BAREA, J.M.; SAGGIN-JÚNIOR, O.J.; SILVA, E.M.R. Solubilização de fosfatos em meios sólido e líquido por bactérias e fungos do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, p.1149-1152, 2005.
- SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. Auxin and Plant-Microbe Interactions. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 3:a001438, 2015.
- SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiololy Letters**, v.31, p.425–448, 2007a.
- STAMFORD, N.P.; MOURA, P.M.; LIRA-JÚNIOR, M.A.; SANTOS, C.; DUENHAS, L.H.; GAVA, C. Chemical attributes of an Argisoil of the Vale do São Francisco after melon growth with phosphate and potash rocks biofertilizers. **Horticultura Brasileira**, v.27, p.447- 452, 2009.
- STAMFORD, N.P.; SANTOS, P.R.; MOURA, A.M.M.F.; SANTOS, C.E.R.S.; FREITAS, A.D.S. Biofertilizers with natural phosphate, sulphur and

- Acidithiobacillus in a soil with low available-P. **Scientia Agricola**, v.60, p767-773, 2003.
- STEWART, G. G.; RUSSELL, I.; GARRISON, I. F. Some considerations of the flocculation characteristics of ale and larger yeast strains. **Journal of the Institute of Brewing**, v.81, p.248-257, 1975.
- STRICKLAND, J. D.; PARSONS, T. R. A manual of seawater analysis. **Fisheries Research Board of Canada**, v.125, p.1-185, 1960.
- SUN, P.; FANG, W.; SHIN, L.; WEL, J.; FU, S.; CHOU, J. Indole-3-Acetic Acid-Producing Yeast in Phyllosphere of the Carnivorous Plant *Drosera indica* L. **Plos One**, v.9, p.1-22, 2014.
- TOYOMASU, T.; TSUJI, H.; YAMANE, H.; NAKAYAMA, M.; YAMAGUCHI, I.; MUROFUSHI, N.; TAKAHASHI, N.; INOUE, Y. Light effects on endogenous levels of gibberellins in photoblastic lettuce seeds. **Plant Growth Regulations**, v.12, p.85-90, 1993.
- TROMAS, A.; PERROT-RECHENMANN, C. Progrès récents dans la biologie de l'auxine. **Comptes Rendus Biologies**, v.333, p.297-306, 2010.
- TSANG, P. Differential Phytate Utilization in *Candida* species. **Mycopathologia**, v.172, p.473–479, 2011.
- TSAVKELOVA, E. A.; CHERDYNTSEVA, T. A.; NETRUSOV, A. I.; BOTINA, S. G. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. **Microbiological Research**, v.162, p.69-76, 2007.
- TSAVKELOVA, E. A.; KLIMOVA, S.Y.; CHERDYNTSEVA, T. A.; NETRUSOV, A. I. Microbial Producers of Plant Growth Stimulators and Their Practical Use: A Review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.42, p.117–126, 2006.
- VAN RAIJ, B. **Fertilidade do solo e adubação**. Piracicaba: Ceres; Potafos, 1991.
- VARGAS, L. K.; LISBOA, B. B.; SCHLINDWEIN, G.; GRANADA, C. E.; GIONGO, A.; BENEDUZI, A.; PASSAGLIA, L. M. P. Occurrence of plant growth-promoting traits in clovernodulating rhizobia strains isolated from different soils in Rio Grande do Sul state. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.33, n.5, p.1227-1235, 2009.
- VASSILEVA, M.; AZCON, R.; BAREA, J. M.; VASSILEV, N. Rock phosphate solubilization by free and encapsulated cells of *Yarrowia lipolytica*. **Process Biochemistry**, v.35, p.693–697, 2000.

- VAZQUEZ, P.; HOLGUIN, G.; PUENTE, M.E.; LOPEZ-CORTES, A.; BASHAN, Y. Phosphatesolubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. **Biology and Fertility of Soils**, v.30, p.460-468, 2000.
- VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E.L.; MARRA, R.; WOO, S.L.; LORITO, M. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. **Soil Biology & Biochemistry**, v.40, p.1–10, 2008.
- VISHNIAC, H. S. Simulated in situ competitive ability and survival of a representative soil yeasts, *Cryptococcus albidus*. **Microbial Ecology**, v.30, p.309-320, 1995.
- VITOUSEK, P. M.; CASSMAN, K.; CLEVELAND, C.; CREWS, T.; FIELD, C. B.; GRIMM, N. B.; HOWARTH, R. W.; MARINO, R.; MARTINELLI, L.; RASTETTER, E. B. SPRENT, J. I. Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. **Biogeochemistry**, v.57/58, p.1-45, 2002.
- VORONEY, R. P. The Soil Habitat. In: Soil Microbiology and Biochemistry. **Paul E. A.** (Ed.), 3.ed., p.25-49, 2007.
- WACHÉ, Y.; HUSSON, F.; FERON, F.; BELIN, G. Yeasts as na efficient biocatalyst for the production of lipid-derived flavours and fragrances. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.89, p.405-416, 2006.
- WANG, W. L.; CHI, Z. M.; LI, J.; WANG, X. H. Siderophore production by the marine-derived *Aureobasidium pullulans* and its antimicrobial activity. **Bioresource Technology**, v.100, p.2639-2641, 2009.
- WANG, X.S.; WU, Q.N.; WU, Y.F.; CHEN, G.Y.; YUE, W.; LIANG, Q.L. Response surface optimized ultrasonicassisted extraction of flavonoids from Sparganii Rhizoma and evaluation of their in vitro anti-oxidant activities [J]. **Molecules**, v.17, p.6769-6783, 2012.
- WHIPPS, J. M. Developments in the biological control of soil-borne plant pathogens. **Advances in Botanical Research**, v.26, p.1–134, 1997.
- WHITELAW, M. A. Growth promotion of plant inoculated with phosphate-solubilizing fungi. **Advances in Agronomy**, v.69, p.99-151, 2000.
- WILLIAMS, L. E.; MILLER, A. J. Transporters responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.52, p.659-688, 2001.
- XIAO, C.; CHI, R.; PAN, X.; LIU, F.; HE, J. Rock phosphate solubilization by four yeast strains. **Annals of Microbiology**, v.63, p.173–178, 2013.

- XIN, G.; GLAWE, D.; DOTY, S. L. Characterization of three endophytic, indole-3-acetic acid-producing yeasts occurring in *Populus trees*. **British Mycological Society**, *Mycological Research*, v.113, p.973 – 980, 2009.
- XINXIAN, L.; XUEMEI, C.; YAGANG, C.; WOON-CHUNG, W.; ZEBIN, W.; QITANG, W. Isolation and characterization endophytic bacteria from hyperaccumulator *Sedum alfredii* Hance and their potential to promote phytoextraction of zinc polluted soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.27, p.1197–1207, 2011.
- YANG, C.H.; CROWLEY, D.E. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.345-351, 2000.
- YARROW, D. Methods for the isolation maintenance, and identification of yeasts In: KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. *The yeast: a taxonomic study*. **Elsevier**, p.77-100, 1998.
- YU, T.; YU, C.; LU, H.; ZUNUN, M.; CHEN, F.; ZHOU, T.; SHENG, K.; ZHENG, X. Effect of *Cryptococcus laurentii* and calcium chloride on control of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* infections in pear fruit. **Biological Control**, v.61, p.169-175, 2012.
- ZAKHAROVA, E. A.; SHCHERBAKOV, A. A.; BRUDNIK, V. V.; SKRIPKO, N. G.; BULKHIN, N. S.; IGNATOV, V. V. Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*: insights from quantum chemistry. **European Journal of Biochemistry**, v.259, p.572-576, 1999.
- ZHAO, Y. Auxin Biosynthesis and Its Role in Plant Development. **Annual Review of Plant Biology**, v.61, p.49–64, 2010.
- ZHU, P.M.; YANG, X.M.; XU, Y.C.; OUVANG, H.; SHEN, Q.R. High effective phosphatesolubilizing bacteria: their isolation and promoting effect on corn seedling growth. **Ying Yong Sheng Tai Xue Bao**, v.18, p.107-112, 2007.
- ZÚÑIGA, A.; POUPIN, M. J.; DONOSO, R.; LEDGER, T.; GUILIANI, N.; GUTIÉRREZ, R. A.; GONZÁLEZ, B. Quorum Sensing and Indole-3-Acetic Acid Degradation Play a Role in Colonization and Plant Growth Promotion of *Arabidopsis thaliana* by *Burkholderia phytofirmans* PsJN. **Molecular Plant-Microbe Interactions Journal**, v.26, p.546-553, 2013.