



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

PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO *IN VITRO* POR *Torulaspora globosa*

JÉSSICA ALBERTINI

ARARAS

2017



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

PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO *IN VITRO* POR *Torulaspora globosa*

JÉSSICA ALBERTINI

ORIENTADOR: PROFA. DRA. MÁRCIA MARIA ROSA MAGRI

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

ARARAS

2017

Albertini, Jéssica

Produção de ácido indol acético in vitro por *Torulaspora globosa* / Jéssica Albertini. -- 2017.
55 f. : 30 cm.

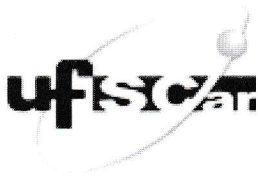
Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, campus Araras, Araras

Orientador: Márcia Maria Rosa Magri

Banca examinadora: Silvana Perissatto Meneghin, Francisco Eduardo de Carvalho Costa

Bibliografia

1. Ácido indol acético. 2. Leveduras. 3. Microbiologia Agrícola. I. Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.



Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Jéssica Albertini, realizada em 02/05/2017:

Profa. Dra. Marcia Maria Rosa Magri
UFSCar

Profa. Dra. Silvana Perissatto Meneghin
UFSCar

Prof. Dr. Francisco Eduardo de Carvalho Costa
Inatel

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, primeiramente, a *Deus*, por essa oportunidade e por me dar uma família maravilhosa que sempre me apoia e acredita nos meus sonhos.

À *Universidade Federal de São Carlos, Campus de Araras* e ao curso de *Pós-graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados* pela formação profissional e oportunidade de ensino.

À minha orientadora *Dr^a Márcia Maria Rosa Magri* pela oportunidade de desenvolver este projeto, me orientando sempre com muita paciência e compreensão e pela amizade.

Aos meus colegas do *LAMAM* que transformaram o trabalho diário em momentos agradáveis e divertidos e aos meus amigos queridos que sempre me apoiaram e acreditaram no meu potencial.

À banca examinadora do Exame de Qualificação e da Defesa, *Profa. Dra. Silvana Perissatto Meneghin, Profa. Dra. Sandra Ceccato Antonini, Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos, Prof. Dr. Francisco Eduardo Carvalho de Costa* e aos demais professores do programa pelos ensinamentos e por participarem desta etapa importante em minha vida.

Aos meus pais, *Reinaldo e Maria*, que são minha inspiração, orgulho e porto seguro, os quais amo imensamente e agradeço por todo apoio e por acreditarem em mim, sem vocês nada disso seria possível.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram com esta etapa da minha vida.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
3 REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1. Leveduras	4
3.2. Auxinas	5
3.3. Produção de AIA por micro-organismos.....	8
3.3. Leveduras Produtoras de AIA	9
4 MATERIAIS E MÉTODOS	12
4.1. Coleta das amostras de rizosfera para isolamento das leveduras	12
4.2. Isolamento de leveduras da rizosfera	13
4.3. Seleção de linhagens com potencial para produção de AIA.....	13
4.4. Avaliação dos fatores envolvidos na produção de AIA, na variação do pH do meio e no crescimento celular de <i>Torulaspóra globosa</i> (6S01) através de planejamento experimental com análise multivariada	14
4.5. Influência da agitação do cultivo em meio líquido de <i>T. globosa</i> (6S01) na produção de AIA, variação do pH e crescimento celular.....	16
4.6. Produção de AIA em diferentes concentrações de fonte de N	17
4.7. Produção de AIA sem adição de triptofano	17
4.8. Produção de AIA na presença de diferentes fontes de nitrogênio.....	18
4.9. Produção de AIA em níveis diferentes de pH inicial do meio.....	18
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5.1. Coleta das amostras de rizosfera para isolamento das leveduras	20
5.2. Seleção de linhagens com potencial para produção de AIA.....	21
5.3. Avaliação dos fatores envolvidos na produção de AIA, na variação do pH do meio e no crescimento celular de <i>Torulaspóra globosa</i> (6S01) através de planejamento experimental com análise multivariada	23
5.3.1. Produção de AIA	23
5.3.2. Variação do pH do meio de cultivo	28
5.3.3. Crescimento celular.....	32
5.4. Influência da agitação do cultivo em meio líquido de <i>T. globosa</i> (6S01) na produção de AIA, variação do pH e crescimento celular.....	34

5.5. Influência da fonte de N na produção de AIA por <i>T. globosa</i> (6S01)	36
5.6. Avaliação da produção de AIA por <i>T. globosa</i> (6S01) em meio sem adição de triptofano	39
5.7. Avaliação da produção de AIA por <i>T. globosa</i> (6S01) em meio com diferentes valores de pH inicial.....	40
6 CONCLUSÕES	42
7 LITERATURA CITADA	44
ANEXOS.....	53

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Níveis e valores originais no planejamento fatorial fracionado.....	15
Tabela 2. Delineamento fatorial fracionado (2^{5-1})	15
Tabela 3. Leveduras isoladas da rizosfera de milho e cana-de-açúcar	20
Tabela 4. Produção de AIA por <i>T. globosa</i> (6S01) nos ensaios com análise multivariada.....	25
Tabela 5. Produção de AIA sob o fornecimento de diferentes fontes de N no meio.....	38
Tabela 6. Crescimento celular após 36 horas em diferentes níveis de pH inicial	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Rotas de síntese do ácido indol acético (AIA) a partir do triptofano. A) Rota do ácido indolpirúvico; B) Rota da triptamina; C) Rota da indolacetaldoxima	7
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. (A) – resultado na presença dos isolados de levedura; (B) – amostras controle, meio de cultivo sem levedura.	22
Figura 3. Produção de AIA a partir da combinação dos fatores (Ensaio 1 – pH inicial 3, 25° C, 100 rpm, 10 g/L Glicose, 15 g/L Nitrato de Amônio; Ensaio 2 – pH inicial 7, 25° C, 100 rpm, 10 g/L Glicose, 5 g/L Nitrato de Amônio; Ensaio 3 – pH inicial 3, 35° C, 100 rpm, 10 g/L Glicose, 5 g/L Nitrato de Amônio; Ensaio 4 – pH inicial 7, 35° C, 100 rpm, 10 g/L Glicose, 15 g/L Nitrato de Amônio; Ensaio 5 – pH inicial 3, 25° C, 200 rpm, 10 g/L Glicose, 5 g/L Nitrato de Amônio).....	26
Figura 4. Produção de AIA a partir da combinação dos fatores (Ensaio 6 – pH inicial 7, 25° C, 200 rpm, 10 g/L Glicose, 15 g/L Nitrato de Amônio; Ensaio 7 – pH inicial 3, 35° C, 200 rpm, 10 g/L Glicose, 15 g/L Nitrato de Amônio; Ensaio 8 – pH inicial 7, 35° C, 200 rpm, 10 g/L Glicose, 5 g/L Nitrato de Amônio; Ensaio 9 – pH inicial 3, 25° C, 100 rpm, 30 g/L Glicose, 5 g/L Nitrato de Amônio; Ensaio 10 – pH inicial 7, 25° C, 100 rpm, 30 g/L Glicose, 15 g/L Nitrato de Amônio).....	26
Figura 5. Produção de AIA a partir da combinação dos fatores (Ensaio 11 – pH inicial 3, 35° C, 100 rpm, 30 g/L Glicose, 15 g/L Nitrato de Amônio; Ensaio 12 – pH inicial 7, 35° C, 100 rpm, 30 g/L Glicose, 5 g/L Nitrato de Amônio; Ensaio 13 – pH inicial 3, 25° C, 200 rpm, 30 g/L Glicose, 15 g/L Nitrato de Amônio; Ensaio 14 – pH inicial 7, 25° C, 200 rpm, 30 g/L Glicose, 5 g/L Nitrato de Amônio; Ensaio 15 – pH inicial 3, 35° C, 200 rpm, 30 g/L Glicose, 5 g/L Nitrato de Amônio).....	27
Figura 6. Produção de AIA a partir da combinação dos fatores (Ensaio 16 – pH inicial 7, 35° C, 200 rpm, 30 g/L Glicose, 15 g/L Nitrato de Amônio; Ensaio 17, 18 e 19 – pH inicial 5, 30° C, 150 rpm, 20 g/L Glicose, 10 g/L Nitrato de Amônio)	27
Figura 7. Variação do pH do meio de cultura (Ensaio 1 - pH inicial 3, 25° C, 100 rpm, 10 g/L Glicose, 15 g/L Nitrato de Amônio; Ensaio 2 - pH inicial 7, 25° C, 100 rpm, 10 g/L Glicose, 5 g/L Nitrato de Amônio; Ensaio 3 – pH inicial 3, 35° C, 100 rpm, 10 g/L Glicose, 5 g/L Nitrato de Amônio; Ensaio 4 – pH inicial 7, 35° C, 100 rpm, 10 g/L Glicose, 15 g/L Nitrato de Amônio; Ensaio 5 - pH inicial 3, 25° C, 200 rpm, 10 g/L Glicose, 5 g/L Nitrato de Amônio)	30
Figura 8. Variação do pH do meio de cultura (Ensaio 6 – pH inicial 7, 25° C, 200 rpm, 10 g/L Glicose, 15 g/L Nitrato de Amônio; Ensaio 7 – pH inicial 3, 35° C, 200 rpm, 10	

g/L Glicose, 15 g/L Nitrato de Amônio; Ensaio 8 – pH inicial 7, 35° C, 200 rpm, 10 g/L Glicose, 5 g/L Nitrato de Amônio; Ensaio 9 – pH inicial 3, 25° C, 100 rpm, 30 g/L Glicose, 5 g/L Nitrato de Amônio; Ensaio 10 – pH inicial 7, 25° C, 100 rpm, 30 g/L Glicose, 15 g/L Nitrato de Amônio)	30
Figura 9. Variação do pH do meio de cultura (Ensaio 11 – pH inicial 3, 35° C, 100 rpm, 30 g/L Glicose, 15 g/L Nitrato de Amônio; Ensaio 12 – pH inicial 7, 35° C, 100 rpm, 30 g/L Glicose, 5 g/L Nitrato de Amônio; Ensaio 13 – pH inicial 3, 25° C, 200 rpm, 30 g/L Glicose, 15 g/L Nitrato de Amônio; Ensaio 14 – pH inicial 7, 25° C, 200 rpm, 30 g/L Glicose, 5 g/L Nitrato de Amônio; Ensaio 15 – pH inicial 3, 35° C, 200 rpm, 30 g/L Glicose, 5 g/L Nitrato de Amônio)	31
Figura 10. Variação do pH do meio de cultura (Ensaio 16 – pH inicial 7, 35° C, 200 rpm, 30 g/L Glicose, 15 g/L Nitrato de Amônio; Ensaio 17, 18 e 19 – pH inicial 5, 30° C, 150 rpm, 20 g/L Glicose, 10 g/L Nitrato de Amônio).	31
Figura 11. Crescimento celular da levedura (Ensaio 1 – pH inicial 3, 25° C, 100 rpm, 10 g/L Glicose, 15 g/L Nitrato de Amônio; Ensaio 2 – pH inicial 7, 25° C, 100 rpm, 10 g/L Glicose, 5 g/L Nitrato de Amônio; Ensaio 3 – pH inicial 3, 35° C, 100 rpm, 10 g/L Glicose, 5 g/L Nitrato de Amônio; Ensaio 4 – pH inicial 7, 35° C, 100 rpm, 10 g/L Glicose, 15 g/L Nitrato de Amônio; Ensaio 5 – pH inicial 3, 25° C, 200 rpm, 10 g/L Glicose, 5 g/L Nitrato de Amônio)	33
Figura 12. Crescimento celular da levedura (Ensaio 6 – pH inicial 7, 25° C, 200 rpm, 10 g/L Glicose, 15 g/L Nitrato de Amônio; Ensaio 7 – pH inicial 3, 35° C, 200 rpm, 10 g/L Glicose, 15 g/L Nitrato de Amônio; Ensaio 8 – pH inicial 7, 35° C, 200 rpm, 10 g/L Glicose, 5 g/L Nitrato de Amônio; Ensaio 9 – pH inicial 3, 25° C, 100 rpm, 30 g/L Glicose, 5 g/L Nitrato de Amônio; Ensaio 10 – pH inicial 7, 25° C, 100 rpm, 30 g/L Glicose, 15 g/L Nitrato de Amônio)	33
Figura 13. Crescimento celular da levedura (Ensaio 11 – pH inicial 3, 35° C, 100 rpm, 30 g/L Glicose, 15 g/L Nitrato de Amônio; Ensaio 12 – pH inicial 7, 35° C, 100 rpm, 30 g/L Glicose, 5 g/L Nitrato de Amônio; Ensaio 13 – pH inicial 3, 25° C, 200 rpm, 30 g/L Glicose, 15 g/L Nitrato de Amônio; Ensaio 14 – pH inicial 7, 25° C, 200 rpm, 30 g/L Glicose, 5 g/L Nitrato de Amônio; Ensaio 15 – pH inicial 3, 35° C, 200 rpm, 30 g/L Glicose, 5 g/L Nitrato de Amônio)	34
Figura 14. Crescimento celular da levedura (Ensaio 16 – pH inicial 7, 35° C, 200 rpm, 30 g/L Glicose, 15 g/L Nitrato de Amônio; Ensaio 17, 18 e 19 – pH inicial 5, 30° C, 150 rpm, 20 g/L Glicose, 10 g/L Nitrato de Amônio).....	34
Figura 15. Comparação do crescimento celular em cultivo com e sem agitação (dados em absorbância a 600 nm).....	35
Figura 16. Comparação da produção de AIA em cultivo com e sem agitação.	36

Figura 17. Comparação da produção de AIA perante diferentes quantidades de nitrogênio no meio de cultivo.....	37
Figura 18. Produção de AIA com adição ou não de diferentes fontes de N, após 36 horas de incubação	38
Figura 19. Produção de AIA após 36 horas em diferentes níveis de pH inicial	41

PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO *IN VITRO* POR *Torulaspota globosa*

Autor: JÉSSICA ALBERTINI

Orientador: Profa. Dra. MÁRCIA MARIA ROSA MAGRI

RESUMO

O ácido indol acético (AIA) é um fitormônio capaz de proporcionar respostas rápidas ao desenvolvimento das plantas, como alongação celular, diferenciação e divisão das células. Sabe-se que na rizosfera há leveduras capazes de auxiliar o desenvolvimento vegetal, por meio da produção de AIA. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi isolar leveduras da rizosfera, e selecionar linhagens capazes de produzir AIA; a linhagem selecionada foi avaliada quanto a influência da temperatura, pH, agitação, carbono e nitrogênio na produção de AIA. Para o isolamento, foram amostradas rizosfera de milho e cana-de-açúcar de área do campus da UFSCar, Araras/SP. As amostras foram plaqueadas em meio YEPD, Sabouraud e BDA. As linhagens foram selecionadas utilizando metodologia colorimétrica, com reagente de Salkowsky. A linhagem com melhores resultados foi avaliada quanto a influência de fatores na produção de AIA, através de planejamento experimental com análise multivariada. Foram isoladas 6 linhagens de levedura; a linhagem 6S01, identificada como *Torulaspota globosa*, foi selecionada. Os resultados da análise multivariada mostraram que, dentre os fatores estudados, os que afetaram significativamente a produção de AIA foram pH, agitação e nitrogênio. O pH apresentou a maior influência pois afetou a produção, de forma significativa, em todos os tempos avaliados; os maiores valores de produção registrados foram obtidos no tratamento em que o pH inicial do meio foi ajustado para 9,0. As maiores produções ocorreram entre 24 e 48 horas de incubação, sendo a produção máxima obtida de 217,73 µg/mL. Foi observado que, nos ensaios em que não houve adição de fonte de nitrogênio no meio de cultura, a produção foi maior; provavelmente o triptofano, fornecido como molécula precursora da síntese de AIA, foi utilizado pela levedura como fonte de nitrogênio, sendo melhor absorvido na ausência de outras fontes do nutriente. Conclui-se que a levedura *T. globosa* (6S01), isolada de rizosfera de milho apresenta alta capacidade de produção de AIA, com potencial para produção em larga escala; as melhores condições para a produção são na ausência de fonte de nitrogênio e em meio alcalino.

Palavras-chave: *Torulaspota globosa*; AIA; análise multivariada; pH; nitrogênio; triptofano.

PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO *IN VITRO* POR *Torulaspota globosa*

Author: JÉSSICA ALBERTINI

Adviser: Profa. Dra. MÁRCIA MARIA ROSA MAGRI

ABSTRACT

The indole acetic acid (IAA) is a phytohormone capable of providing fast responses to plant development such as cell elongation and differentiation and division of cells. It is known that exist in the rhizosphere there are yeasts capable of assisting the plant development by the IAA production. In this study, the objective was isolate yeasts of the rhizosphere and select lineages capable of producing IAA; the selected lineage was evaluated for the influence of temperature, pH, agitation, carbon and nitrogen on the production of IAA. For isolation, corn rhizosphere and sugarcane were sampled from the campus area of UFSCar, Araras/SP. The samples were plated on YEPD medium, Sabouraud and BDA. The lineages were selected using colorimetric methodology, with Salkowsky reagent. The best results were evaluated for the influence of factors in the production of AIA, through experimental planning with multivariate analysis. Six yeast strains were isolated; the strain 6S01, identified as *Torulaspota globosa*, was selected. The results of the multivariate analysis show that among the studied factors, which significantly affected the production of IAA were pH, agitation and nitrogen. The pH showed the greatest influence on production, because it affected significantly at all times evaluated; the highest recorded production values were obtained in the treatment in which the initial pH of the medium was adjusted to 9,0. The highest yields occurred between 24 and 48 hours of incubation, and the maximum production was 217,73 µg/mL. It was observed that, in the tests in which there was no addition of nitrogen source in the culture medium, the production was higher; probably tryptophan provided as a precursor molecule of AIA synthesis was used by the yeast as a nitrogen source and was better absorbed in the absence of other sources of the nutrient. It is concluded that the yeast *T. globosa* (6S01), isolated from maize rhizosphere presents capacity of high production of IAA, with potential for large scale production; the best conditions for the production are in the absence of nitrogen source and in alkaline medium.

Key-words: *Torulaspota globosa*; IAA; multivariate analysis; pH; nitrogen; tryptophan.

1. INTRODUÇÃO

O solo é um ambiente que apresenta uma grande diversidade microbiana, sendo um ecossistema bastante complexo. É caracterizado por diferentes grupos funcionais, que quando estão em equilíbrio são fundamentais para o funcionamento de diferentes processos, entre eles a ciclagem de nutrientes e o auxílio ao desenvolvimento vegetal. A agricultura, porém, utiliza uma alta quantidade de compostos químicos, entre eles, fertilizantes minerais e defensivos agrícolas, os quais rompem com o equilíbrio do ecossistema edáfico, diminuindo sua biodiversidade. O processo de produção agrícola, entretanto, está preso a um ciclo vicioso, que causa grande dependência do uso desses insumos, indispensáveis para a obtenção da produtividade necessária para ganhos econômicos pelo produtor.

Uma alternativa para uma produção agrícola mais sustentável é o estudo de processos naturais, usando micro-organismos nativos, capazes de proteger e auxiliar o desenvolvimento da planta. Porém, um desafio aos pesquisadores é uma melhor compreensão das funções dos micro-organismos no solo, com o objetivo de estimular a vida microbiana através do manejo, ou da adição de espécies benéficas ao sistema.

Existem micro-organismos que podem ser encontrados naturalmente na rizosfera das plantas, os quais têm a capacidade de produzir compostos hábeis

a ajudar o desenvolvimento vegetal, por meio de diferentes mecanismos. Esses micro-organismos são conhecidos como promotores de crescimento vegetal (MPCV). Entre esses mecanismos está a produção de hormônios vegetais, sideróforos, solubilização e mobilização de fósforo, disponibilização de minerais no solo, além do controle biológico de fitopatógenos e indução de resistência vegetal, promovendo uma maior proteção às plantas (GRAY & SMITH, 2005).

Uma classe de fitormônios produzidos pelos MPCV bastante conhecida são as auxinas, sendo seu principal representante o ácido indol acético, conhecido por estimular rapidamente e em longo prazo, respostas às plantas (CLELAND, 1990). Entre os micro-organismos capazes de produzir quantidades significativas de AIA estão as bactérias (KHALID et al., 2004; AHEMAD 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), promovendo resultados importantes no crescimento e desenvolvimento das plantas.

São descritas na literatura leveduras rizosféricas (rizoleveduras), que mostraram capacidade de produzir compostos para promoção de crescimento vegetal (CLOETE et al., 2009; NUTARATAT et al., 2014; LIMTONG et al., 2014), através do 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 N e S (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).

A expansão do conhecimento sobre o comportamento das leveduras no solo, e a forma como esse grupo pode auxiliar no processo de produção é o grande desafio desta área. A compreensão destes micro-organismos pode contribuir para o equilíbrio do ecossistema, minimizando o uso de produtos tóxicos, como adubos químicos e fungicidas, responsáveis pela poluição do solo, lençol freático, rios e lagos, sendo também causadores em potencial de doenças e morte de animais e seres humanos.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

O objetivo deste trabalho foi isolar e selecionar leveduras rizosféricas produtoras de ácido indol acético (AIA), e avaliar a influência de diferentes fatores (temperatura, pH, agitação, quantidade de fonte de carbono e nitrogênio) nesta produção.

2.2. Específico

- Isolar leveduras rizosféricas de cana-de-açúcar e milho;
- Selecionar isolados capazes de produzir AIA *in vitro*;
- Quantificar a produção de AIA sob influência dos fatores: temperatura, pH, agitação e adição de fonte de carbono e nitrogênio.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Leveduras

Leveduras são seres eucariontes, caracterizados como fungos unicelulares, não filamentosos, podendo apresentar células esféricas, ovais ou elípticas, com tamanhos que variam entre 1 a 5 μm de largura por 5 a 30 μm de comprimento. São amplamente encontradas na natureza, sendo a espécie *Saccharomyces cerevisiae* uma espécie muito estudada e empregada em diversos processos biotecnológicos (PELCZAR, 1997).

A reprodução vegetativa das leveduras é realizada por brotamento ou gemulação. As leveduras também produzem esporos sexuais, os quais são produzidos em função da produção de híbridos, e desta forma, permite a variabilidade genética das espécies perante as alterações do ambiente (GUIMARÃES, 2005).

As leveduras apresentam de 68% a 83% de água em sua composição, além de substâncias nitrogenadas, carboidratos, lipídios, vitaminas, minerais entre outros (TORTORA; FUNKE; CASE, 2002). Para obtenção de energia, as leveduras dependem de fontes de carbono orgânico, sendo assim os carboidratos são os nutrientes de importância maior. Açúcares simples como a

glicose, frutose e manose são assimiladas pela maioria das espécies estudadas, enquanto alguns oligossacarídeos, polissacarídeos, alcoóis primários, polióis, ácidos orgânicos, pentoses, tetroses, hidrocarbonetos e lipídeos são utilizados seletivamente por algumas espécies.

Ainda que os açúcares sejam apontados como fonte de carbono, há diferença entre a capacidade de uma levedura em assimilar um açúcar e a capacidade de fermentar o mesmo açúcar (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2000; VIEIRA, 2011). Critérios importantes utilizados para a identificação de espécies de leveduras são as diferenças na fermentação e assimilação de compostos de carbono. Gêneros *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Torulaspota* e *Zygosaccharomyces* apresentam uma fermentação vigorosa da glicose, enquanto outros são exclusivamente não fermentativos, como *Lipomyces* e *Sterigmatomyces* (WALT; YARROW, 1984).

As leveduras têm grande importância econômica para a indústria. As leveduras influenciam muitos setores, como por exemplo, as indústrias de alimentos, bebidas, produtos químicos, enzimas industriais, produtos farmacêuticos, produtos agrícolas e biocombustíveis. Estima-se que a produção tradicional de álcool etílico por indústrias cervejeiras, indústrias de bebidas destiladas e de combustíveis, vinícolas, e a produção de biomassa pela indústria alimentícia, promovem a maior quantidade de produtos fermentados do mundo (PRETORIUS; TOIT; RENSBURG, 2003).

3.2. Auxinas

Auxina é um termo de origem do grego *auxein*, que tem como significado “crescer” ou “aumentar”. Auxina é um hormônio, produzido pelas plantas, que apresenta funções relacionadas ao alongamento e divisão celular (TAIZ & ZEIGER, 2004). O alongamento ocorre com a acidificação da parede celular, que é causada pela liberação de prótons para fora da membrana plasmática. A expulsão de prótons induz enzimas que estão presentes na membrana plasmática a romper ligações glicosídicas entre polissacarídeos da parede celular, provocando o seu afrouxamento e a diminuição da resistência mecânica da parede celular (TAIZ & ZEIGER, 2004).

A entrada de água na célula e o aumento da pressão são favorecidos pela diferença de potencial hídrico, que resulta no alongamento da parede celular (SALISBURY & ROSS, 1992). Tecidos com capacidade de rápida divisão celular e crescimento, como meristemas apicais, folhas jovens, gemas, extremidades de raízes, frutos e sementes em desenvolvimento, estão associados especialmente a biossíntese de auxinas (SALISBURY & ROSS, 1992; ARTECA, 1995; TAIZ & ZEIGER, 2004).

Uma auxina muito importante para as plantas é o ácido indol acético (AIA), essa substância é produzida principalmente no meristema apical (gema) do caule e conduzida para as raízes por meio das células do parênquima. Dependente de energia para acontecer, o transporte do AIA é unidirecional e ajuda no crescimento de raízes e caules por meio do alongamento das células recém-formadas nos meristemas. Entretanto, esse efeito depende da concentração do hormônio na planta.

A presença da auxina é indispensável em dois estágios da planta, na iniciação e no desenvolvimento radicial (SMITH & THORPE, 1975). O primeiro estágio é estabelecido pela ocorrência da iniciação meristemática e o segundo pelo desenvolvimento de órgãos. Outras substâncias sintéticas com atividade semelhante à do AIA foram encontradas após sua descoberta, dentre elas estão alguns fitohormônios como o ácido indol butírico (AIB) e o ácido naftaleno acético (ANA), utilizados para favorecer a iniciação radicial.

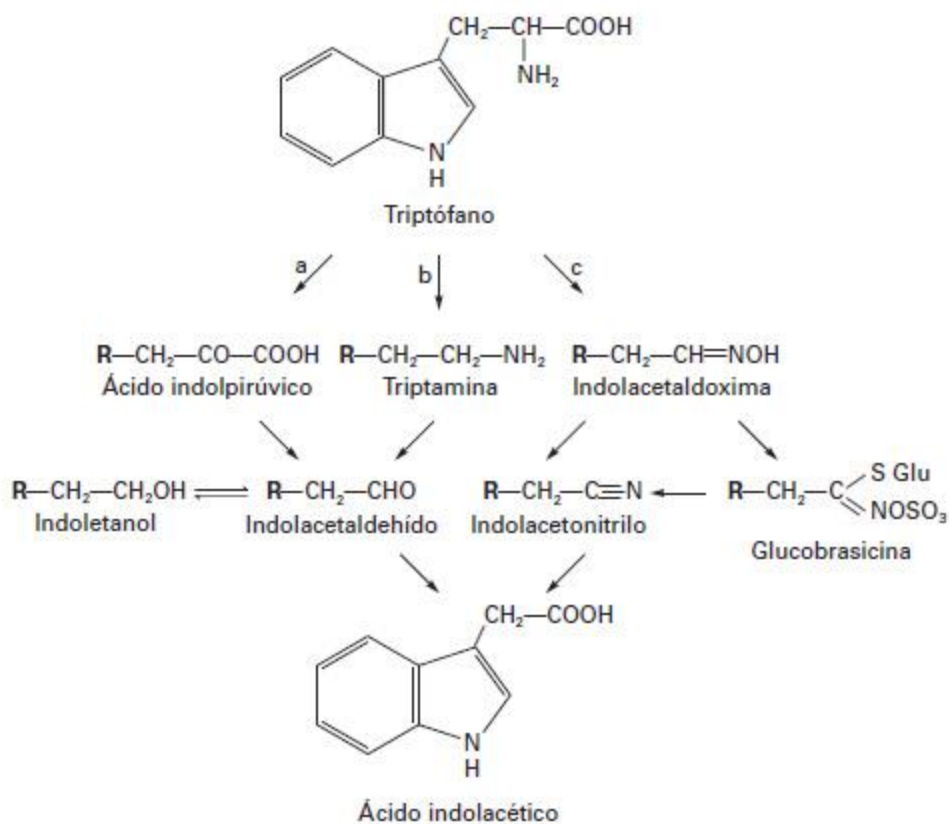
O AIA desempenha papéis importantes em plantas, tais como a estimulação da divisão celular, o alongamento das células, diferenciação celular, luz e respostas gravitacionais, regulação e queda de folhas e amadurecimento (TROTSENKO et al., 2001; TEALE et al., 2006), e oferece maior proteção para as plantas de stress externo (BIANCO & DEFEZ, 2009).

Além disso, o AIA serve como um agente de regulação de diferenciação de células microbianas; por exemplo, ele estimula a germinação de esporos e alongamento de micélio em isolados de actinomicetos (MATSUKAWA et al., 2007), e induz a filamentação (crescimento invasivo) e a adesão do substrato em baixas concentrações de AIA em *Saccharomyces cerevisiae* (PRUSTY et al., 2004).

Vários tipos de micro-organismos como bactérias, fungos, leveduras e algas são capazes de sintetizar e excretar AIA, a partir do triptofano como

precursor. A conversão do triptofano em AIA pode ocorrer por diferentes vias (Figura 1). Na maioria das espécies de plantas, a rota mais comum é o ácido indolpirúvico. Algumas espécies também têm o percurso da triptamina, enquanto o percurso da indolacetaldoxima é característico da família Brassicaceae. A funcionalidade das várias vias é confirmada pela presença de compostos endógenos como intermediários, atividade biológica dos intermediários (isto é, a sua capacidade para produzir respostas características de auxina, quando aplicado a plantas), formação de AIA quando se adicionam os intermediários as plantas, e a detecção em extratos vegetais de atividades enzimáticas envolvidas nas diferentes reações de cada rota (AZCÓN-BIETO, 2008).

Figura 1 – Rotas de síntese do ácido indol acético (AIA) a partir do triptofano. a) Rota do ácido indolpirúvico; b) Rota da triptamina; c) Rota da indolacetaldoxima (AZCÓN-BIETO, 2008).



Na figura 1 se encontra as rotas de síntese do AIA a partir do triptofano, sendo detalhadas abaixo:

- a) Rota ácido indolpirúvico: A transaminação do triptofano produz ácido indol-pirúvico, que é descarboxilado para gerar indolacetaldeído; a oxidação do aldeído ao ácido produz AIA. Alternativamente, algumas plantas podem reduzir indolacetaldeído a indol-etanol, o que pode influenciar a regulação da biossíntese de AIA.
- b) Rota triptamina: A descarboxilação do triptofano produz triptamina que, depois de uma desaminação oxidativa, se transforma em indolacetaldeído. Este composto é, portanto, um intermediário em comum com a rota acima.
- c) Rota indolacetaldoxima: A descarboxilação oxidativa do triptofano produz indolacetaldoxima que, por perda de água, gera indolacetonitrilo. Esta transformação também pode ocorrer através da formação de glucobrassicina, um metabolito característico da família Brassicaceae. A hidrólise de indolacetonitrilo produz AIA.

Algumas das enzimas que catalisam reações diferentes de cada rota são inespecíficas, e podem ser isoladas apenas em algumas espécies (AZCÓN-BIETO, 2008).

3.5. Produção de AIA por micro-organismos

Os micro-organismos promotores de crescimento vegetal (MPCV) são considerados como promotores diretos ou indiretos do crescimento das plantas. Os MPCV podem exibir uma variedade de espécies responsáveis por influenciar o crescimento das plantas. Os traços comuns incluem a produção de reguladores de crescimento de plantas (auxina, giberelinas e etileno), sideróforos, HCN e produção de antibióticos (AHMAD et al., 2005). 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 linhagens da 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).

Entre os micro-organismos as bactérias associadas com plantas são conhecidas pela habilidade de sintetizar fitohormônios, sendo potencialmente utilizadas para a promoção do crescimento vegetal 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; GRAVEL et al., 2007; HOYOS-CARVAJAL et al., 2009).

3.4. Leveduras produtoras de AIA

Apesar de presente em número menor que bactérias e fungos filamentosos, as leveduras também habitam a rizosfera, a superfície e interior das plantas, produzindo hormônios vegetais; poucos estudos, porém podem ser encontrados sobre esse grupo nesta função. Dentre os trabalhos encontrados na literatura, Nutaratat et al. (2014) isolaram uma linhagem (DMKU-RP31) de *T. globosa* - a mesma espécie de levedura utilizada nesse trabalho – e de *Rhodosporidium paludigenum* (DMKU-RP301), de folhas de arroz na Tailândia, apresentando como principais características, capacidade para produção de AIA e antagonismo contra patógenos de plantas, através da produção de compostos voláteis antifúngicos.

Um isolado da espécie *Meyerozyma guilliermondii* isolado de colmo de milho por Limtong & Koowadjanakul (2012), em cultivo em meio YEPD, complementado com triptofano, produziu 68,1 µg/mL de AIA após 7 dias de cultivo. El-Tarabily (2004) também obteve uma produção de 31,7 µg/mL por um isolado de *Trichosporon asahii* isolado da rizosfera de beterraba sacarina, nas mesmas condições; indicando que provavelmente a produção de AIA é uma característica comum entre muitas espécies de levedura. Neste mesmo trabalho, El-Tarabily (2004) também isolou linhagens capazes de produzir AIA das espécies *Candida valida* e *Rhodotorula glutinis*. As três espécies além da produção de AIA, também demonstraram ser agentes de biocontrole efetivos de amortecimento de plântulas, coroas e raízes de beterrabas maduras, causadas pelo patógeno fúngico *Rhizoctonia solani*.

Estudos mostraram que a levedura *Lindera (Williopsis) saturnus*, isolada da raiz do milho, foi capaz de produzir AIA *in vitro* e promover crescimento das raízes e dos brotos das plântulas, quando inoculadas em sementes de milho (NASSAR et al., 2005). Outro trabalho encontrou três isolados de leveduras endofíticas das espécies *Rhodotorula graminis* e *Rhodotorula mucilaginosa*, obtidas de caules de álamos do gênero *Populus*, como produtoras de AIA *in vitro* (XIN et al., 2009). Além disso, a levedura endofítica *Cryptococcus sp.* CBSB78, isolada de colza (*Brassica chinensis*), embora tenha produzido baixas concentrações de AIA (11,7 µg ml⁻¹), mostrou capacidade de resistência a metais pesados e conseqüentemente promoveu o crescimento de *Brassica spp.* em solos contaminados com metais (DENG et al. 2012).

Sun et al. (2014) isolaram 12 linhagens de leveduras da planta carnívora *Drosera indica*, entre elas 6 produziram baixos níveis de AIA, 5 produziram níveis semelhantes e 1 produziu níveis elevados de AIA em meio de cultivo ácido. Entre as espécies isoladas, um isolado de *Aureobasidium pullulans* (YL-11) produziu 147,4 µg/mL em meio de cultivo YEPD com triptofano a 28°C em pH 6,5; sendo esta a linhagem com maior produção no trabalho nestas condições.

Rosa et al. (2011), isolaram 317 leveduras produtoras de AIA da cana-de-açúcar e milho, sendo que 16 foram obtidas da rizosfera, 78 do colmo e 223 das folhas. Dentre os isolamentos da rizosfera, a amostra retirada do milho forneceu o maior número de leveduras, o mesmo ocorrendo para o colmo; das

folhas de cana-de-açúcar, porém, foi isolado o maior número de leveduras dentre todas as amostras. No geral, a melhor fonte de leveduras neste trabalho foi a folha, seguida do colmo e por último a rizosfera. Este resultado mostra que no solo a população de leveduras é menor em relação à outros grupos microbianos, principalmente bactérias e fungos filamentosos, fato já descrito na literatura (EL-TARABILY e SIVASITHAMPARAM, 2006). Neste trabalho foram isoladas linhagens das espécies *Torulaspóra globosa*, *Candida intermedia* e *Rhodotorula mucilagínosa*.

A produção de AIA não é característica de apenas leveduras endofíticas, mas também pode ser observada em leveduras epífitas, como *Candida maltosa*, isolada do filoplano, e que produziu altas concentrações de AIA (121,4 a 234,1 mg 1⁻¹) quando cultivada em meio YEPD, suplementado com 0,1% de L-triptofano (LIMTONG & KOOWADJANAKUL, 2012). No caso da levedura rizosférica *Candida tropicalis* HY, a produção de baixas quantidades de AIA foi acompanhada por solubilização de fosfato tricálcico e produção de fitase, o que aumenta a liberação de fosfato a partir de materiais contendo fitato disponíveis na natureza (LIMTONG & KOOWADJANAKUL, 2012).

O benefício do emprego de micro-organismos produtores de AIA na agricultura, como inoculante agrícola, é vantajoso em relação à utilização de fitohormônios sintéticos, que é caro e, desta forma, desvantajoso para o produtor (TSAVKELOVA et al., 2006).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta das amostras de rizosfera para isolamento das leveduras

As amostras de rizosfera de cana-de-açúcar e milho foram coletadas em área de latossolo vermelho-escuro, classe textual franco-argilosa; pertencente à Universidade Federal de São Carlos, campus de Araras/SP. O município de Araras está localizado a uma longitude de 47°23'03" a Oeste de Greenwich e a uma latitude de 22°21'25" no sentido Sul; está localizado a 646 metros de altitude. Segundo a classificação climática de Köppen-Geiger o clima é Cwa, possuindo clima quente, chuvas concentradas no verão e inverno seco; temperatura média máxima de 32°C e mínima de 8°C.

Para o isolamento das leveduras foram coletadas duas amostras da rizosfera de cana-de-açúcar (variedade RB867515) e de milho (variedade DBK-390) no mês de fevereiro de 2015. As amostras foram transportadas em sacos

plásticos e encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM). O processo de isolamento no laboratório foi realizado no mesmo dia, logo após a amostragem no campo.

4.2. Isolamento de leveduras da rizosfera

Para o isolamento das leveduras foram retirados 10 g das amostras de cada cultura e adicionados a 90 ml de água destilada em um frasco Erlenmeyer de 250 ml. Os frascos permaneceram em agitação a 150 rpm por 30 minutos em mesa agitadora, a temperatura ambiente. Posteriormente foi realizada a diluição decimal seriada até diluição 10^{-5} , em triplicata, em solução salina (NaCl 0,85%), para possibilitar a obtenção de colônias isoladas de leveduras.

Foram empregados os meios de cultura YEPD (5 g/L extrato de levedura, 20 g/L peptona, 20 g/L glicose, 20 g/L agar); YM (3 g/L extrato de levedura, 3 g/L extrato de malte, 5 g/L peptona, 10 g/L glicose, 20 g/L agar); BDA (39 g do meio comercial (Himedia®) dissolvidos em 1 litro de água destilada) e Sabouraud (10 g/L peptona, 4 g/L glicose, 2 g/L agar). Em todos os meios de cultura foram adicionados antibióticos (0,01% ampicilina e 0,01% ácido nalidíxico) para impedir o crescimento de bactérias.

As diluições foram pipetadas na superfície do meio (0,1 ml), em placa de Petri, e espalhado com auxílio de alça de Drigalski. As placas foram mantidas em incubadora refrigerada a 30°C, durante 5 dias. As colônias que se desenvolveram na superfície do meio foram isoladas, sendo que, para tanto, foram avaliadas características macroscópicas e microscópicas para se certificar que eram colônias de levedura.

Todos os isolados obtidos foram repicados e conduzidos à cultura pura, com auxílio de uma alça de inoculação estéril, por estriamento, em placas de Petri contendo meio sólido YEPD. As placas foram colocadas em estufa a 30°C durante 72 horas, e em seguida foram mantidas sob refrigeração até o início dos experimentos.

4.3. Seleção de linhagens com potencial para produção de AIA

Todos os isolados obtidos foram avaliados quanto ao potencial de produção de AIA, de acordo com a metodologia modificada de diMenna (1957). Frascos erlenmeyer (500 ml), cada um contendo 200 ml de meio de cultura BD (Batata-Dextrose) estéril, receberam uma solução de triptofano 5% (KHALID et al. 2004). Os frascos foram inoculados com uma suspensão de células da levedura para a obtenção de 5×10^4 células.ml⁻¹; em seguida, os frascos foram colocados em incubadora refrigerada com agitação, a 30°C, 160 rpm, e mantidos nesta condição por 3 dias. Frascos não inoculados foram utilizados como controle.

Para a quantificação de AIA produzido, o meio foi centrifugado (3000 rpm por 5 minutos) e 1 ml do sobrenadante de cultivo foi pipetado em tubos teste com a adição de 1 ml do reagente de Salkowski (2 ml de FeCl 0,5 M; 98 ml de ácido perclórico 35%. A solução de FeCl 0,5 M deve ser armazenada em frasco escuro) (modificado de GORDON E WEBER, 1951). Os tubos contendo a mistura foram deixados para reagir por 30 minutos, para o desenvolvimento de coloração rosa, que indica a presença de AIA. A intensidade da cor foi determinada por análise em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 530 nm. A determinação da concentração de AIA produzida foi realizada a partir da confecção de uma curva padrão, com soluções com concentrações conhecidas de AIA, e avaliadas como descrito anteriormente.

O isolado de levedura que apresentou melhor resultado foi identificado, a nível de espécie, no Laboratório de Microbiologia do CEIS (Centro de Estudos de Insetos Sociais) sob coordenação do Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca, através da análise do material genético, utilizando técnicas de biologia molecular, com a amplificação e sequenciamento da região D1/D2 do gene 26S rDNA, e *blast* da sequência no GenBank.

4.4. Avaliação dos fatores envolvidos na produção de AIA por *Torulaspota globosa* (6S01) através de planejamento experimental com análise multivariada

A otimização da produção de AIA pela levedura *Torulaspota globosa* (linhagem 6S01) foi realizada através de ensaios fatoriais, utilizando a análise multivariada; primeiramente foi empregado um planejamento fatorial fracionado

(2^{5-1}), com 3 repetições do ponto central, sendo as 5 variáveis independentes as seguintes: pH inicial do meio, temperatura, agitação, concentração inicial de fonte de carbono e concentração da fonte de nitrogênio. Foram considerados 3 níveis para avaliação; a partir dos resultados deste primeiro planejamento, serão selecionadas as variáveis independentes que se apresentem significativas no processo.

As variáveis de resposta (variáveis dependentes), em todos os ensaios, foram a quantificação de AIA, número de células e o pH do meio; as avaliações foram realizadas após 24, 48, 72 e 96 horas de incubação. A Tabela 1 apresenta as variáveis independentes e os níveis utilizados no planejamento fatorial fracionado (2^{5-1}). A Tabela 2 apresenta o delineamento fatorial correspondente, com as combinações das variáveis e níveis. Foi utilizado o programa estatístico STATISTICA (versão 6.0, da StatSoft, Inc.) para calcular os efeitos principais das variáveis e suas interações, bem como os dados relativos a Análise de Variância (ANOVA).

Tabela 1. Níveis e valores originais no planejamento fatorial fracionado.

Nível	-1	0	+1
pH do meio	3	5	7
Temperatura (°C)	25	30	35
Agitação (rpm)	100	150	200
Glicose (g/L)	10	20	30
Nitrato de Amônio (g/L)	5	10	15

Tabela 2. Delineamento fatorial fracionado (2^{5-1}).

Ensaio	pH do meio (1)	Temperatura (2)	Agitação (3)	Conc. Glicose (4)	Conc. Nitrato de Amônio (5=1234)
1	-1	-1	-1	-1	+1
2	+1	-1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1	-1

4	+1	+1	-1	-1	+1
5	-1	-1	+1	-1	-1
6	+1	-1	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1	-1	+1
8	+1	+1	+1	-1	-1
9	-1	-1	-1	+1	-1
10	+1	-1	-1	+1	+1
11	-1	+1	-1	+1	+1
12	+1	+1	-1	+1	-1
13	-1	-1	+1	+1	+1
14	+1	-1	+1	+1	-1
15	-1	+1	+1	+1	-1
16	+1	+1	+1	+1	+1
17	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0

Os ensaios foram realizados em meio líquido, acondicionados em frascos Erlenmeyer de 500 ml, com 200 ml de meio de cultura BD. Todos os frascos foram inoculados com 5×10^4 células. ml^{-1} de *Torulaspota globosa* (6S01).

A análise de quantificação de AIA foi realizada como descrito no item 4.3. A medida de pH foi realizada em pHmetro digital de bancada. A contagem do número de células foi realizada em microscópio óptico de luz, em câmara de Neubauer.

4.5. Influência da agitação do cultivo em meio líquido de *T. globosa* (6S01) na produção de AIA, variação do pH e crescimento celular

Este experimento foi realizado para avaliação da produção de AIA por *T. globosa* (6S01), na presença e ausência de agitação do cultivo, isto é, em cultivo estático. Foram realizados o cultivo da levedura em frascos Erlenmeyer de 500 ml, com 200 ml de meio de cultura BD líquido estéril (pH 7, 20 g/L de glicose, sem adição de fonte de nitrogênio), complementados com uma solução de triptofano 5%. Foram considerados 2 tratamentos: T1 - frascos incubados em shaker a 150 rpm, 30°C; T2 - frascos em incubadora a 30°C, sem agitação.

Todos os frascos foram inoculados com 5×10^4 células. ml^{-1} de *T. globosa* (6S01). O experimento foi realizado em triplicata, com análises realizadas a 24, 48, 72 e 96 horas de incubação.

A análise de quantificação de AIA foi realizada como descrito no item 4.3. A medida de pH foi realizada em pHmetro digital de bancada. A contagem do número de células foi realizada em microscópio óptico de luz, em câmara de Neubauer.

4.6. Produção de AIA em diferentes concentrações de fonte de N

Neste experimento foi avaliada a influência de concentrações de nitrato de amônio (fonte de nitrogênio) na produção de AIA pela levedura *T. globosa* (6S01). O ensaio foi realizado em frascos Erlenmeyer de 500 ml contendo 200 ml de meio de cultura BD líquido estéril (pH 7 e 20 g/L de glicose), complementado com uma solução de 5% de triptofano. O experimento foi dividido em 4 tratamentos, que continham na composição do meio 0 g/L, 5 g/L, 10 g/L ou 15 g/L de NH_4NO_3 . Todos os tratamentos foram realizados em triplicata. Os frascos foram inoculados com 5×10^4 células. ml^{-1} e mantidos em shaker a 30°C, 150 rpm por 5 dias, com retirada de amostras para análise a cada 24 horas. As análises de quantificação de AIA, número de células e pH foram realizadas de acordo com as técnicas descritas no item 4.3.

4.7. Produção de AIA sem adição de triptofano

Este experimento foi realizado para avaliação da produção de AIA por *T. globosa* (6S01) sem adição de triptofano, principal precursor da produção de AIA. Foram realizados o cultivo da levedura em frascos Erlenmeyer de 500 ml, com 200 ml de meio de cultura BD líquido estéril (pH 5, 20 g/L de glicose, 10 g/L de nitrato de amônio), sem adição de triptofano. O experimento foi realizado em triplicata e todos os frascos foram inoculados com 5×10^4 células. ml^{-1} e mantidos em shaker 30°C, 150 rpm, com retirada de amostra para análise após 36 horas de incubação.

A análise de quantificação de AIA foi realizada como descrito no item 4.3. A medida de pH foi realizada em pHmetro digital de bancada. A contagem

do número de células foi realizada em microscópio óptico de luz, em câmara de Neubauer.

4.8. Produção de AIA na presença de diferentes fontes de nitrogênio

Este experimento foi realizado para avaliação da produção de AIA por *T. globosa* (6S01) perante 2 fontes diferentes de nitrogênio, nitrato de potássio e cloreto de amônia. Foi realizado o cultivo da levedura em frascos Erlenmeyer de 500 ml, com 200 ml de meio de cultura BD líquido estéril (pH 5, 20 g/L de glicose), complementados com uma solução de triptofano 5%. Foram considerados 2 tratamentos: T1 - meio de cultura com 10 g/L de nitrato de potássio; T2 - meio de cultura com 10 g/L de cloreto de amônia. Todos os frascos foram inoculados com 5×10^4 células.ml⁻¹ e mantidos em shaker 30°C a 150 rpm. O experimento foi realizado em triplicata, com retirada de amostra para análises após 36 horas de incubação.

A análise de quantificação de AIA foi realizada como descrito no item 4.3. A medida de pH foi realizada em pHmetro digital de bancada. A contagem do número de células foi realizada em microscópio óptico de luz, em câmara de Neubauer.

4.9. Produção de AIA em níveis diferentes de pH inicial do meio

Este experimento foi realizado para avaliação da produção de AIA pela levedura *T. globosa* (6S01) em diferentes níveis de pH inicial do meio (6, 7, 8 e 9). Foi realizado o cultivo da levedura em frascos Erlenmeyer de 500 ml, com 200 ml de meio de cultura BD líquido estéril (20 g/L de glicose, sem adição de fonte de nitrogênio), complementados com uma solução de triptofano 5%. Foram considerados 4 tratamentos: T1 - meio de cultura com pH inicial ajustado em 6; T2 - meio de cultura com pH inicial ajustado em 7; T3 - meio de cultura com pH inicial ajustado em 8; T4 - meio de cultura com pH inicial ajustado em 9. Foi utilizado NaOH para aumento do pH inicial e H₂SO₄ para diminuição do pH inicial. Todos os frascos foram inoculados com 5×10^4

células.ml⁻¹ e mantidos em shaker 30°C a 150 rpm. O experimento foi realizado em triplicata, com retirada de amostra para análises após 36 horas de incubação.

A análise de quantificação de AIA foi realizada como descrito no item 4.3. A medida de pH foi realizada em pHmetro digital de bancada. A contagem do número de células foi realizada em microscópio óptico de luz, em câmara de Neubauer.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Coleta das amostras de rizosfera para isolamento das leveduras

Foram obtidas no isolamento seis linhagens de levedura, sendo duas de rizosfera de milho e quatro de rizosfera de cana-de-açúcar, sendo codificadas, como descrita na Tabela 3.

Tabela 3 – Leveduras isoladas da rizosfera de milho e cana-de-açúcar.

Código linhagem	Origem
6S01	Milho
6S02	Milho
6S03	Cana-de-açúcar
6S04	Cana-de-açúcar
6S05	Cana-de-açúcar
6S06	Cana-de-açúcar

Segundo El-Tarabily & Sivasithamparam (2006), a comunidade de leveduras no solo é menor, quando comparado ao número de bactérias e

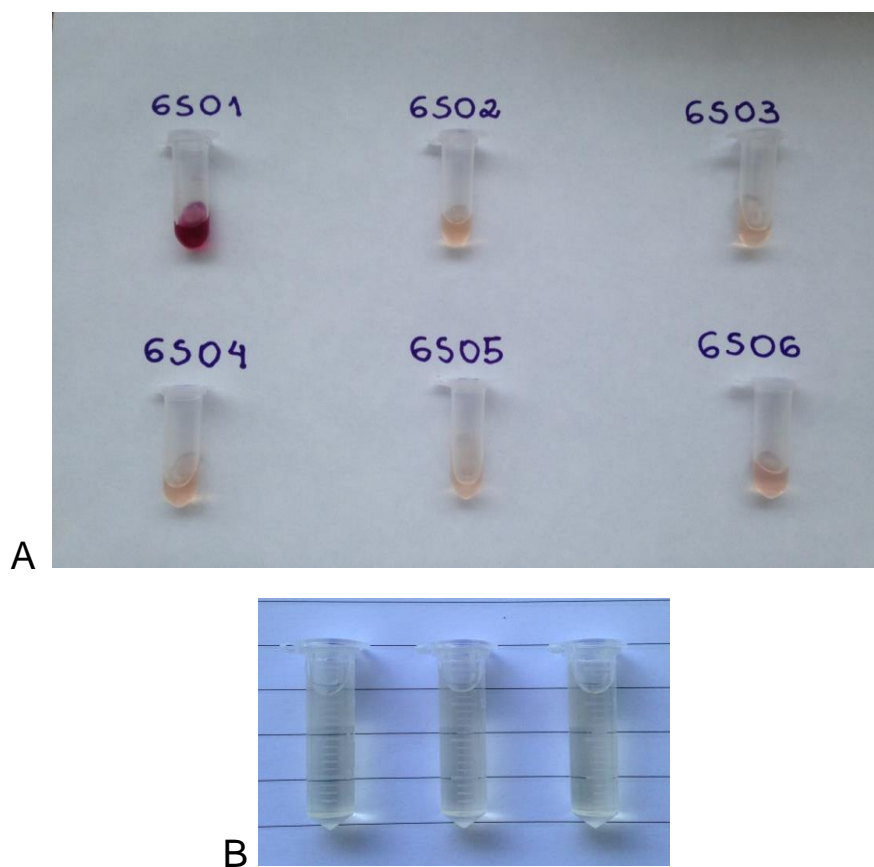
fungos. As leveduras ocorrem principalmente na superfície do solo rico em compostos orgânicos, fornecidos pela decomposição de plantas. Elas podem ser encontradas, também, em ambientes aquáticos, como lagos, mares e rios, e em ambientes terrestres; o ambiente mais propício para o desenvolvimento das leveduras é a superfície das plantas, principalmente devido a maior concentração de açúcares, permitindo que as mesmas se desenvolvam de forma rápida, utilizando de forma eficiente os nutrientes e espaço (FIALHO, 2004; SHARMA et al., 2009).

Na literatura são descritas algumas espécies de levedura isoladas de rizosfera, como dos gêneros *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Lindnera*, *Lipomyces*, *Rhodotorula* e *Schizoblastosporion* (BOTHÁ, 2006; CLOETE et al. 2009; STARMER & LACHANCE, 2011; MESTRE et al. 2011, VAZ et al. 2011). Azeredo et al. (1998) isolou leveduras de plantas de cana-de-açúcar, sendo 103 linhagens da folha, 73 do colmo e 54 da rizosfera. Resultados na mesma proporção foram encontrados por Rosa et al. (2011), sendo isoladas 223 linhagens das folhas, 78 do colmo e 16 da rizosfera. Foram isoladas neste trabalho linhagens das espécies *Torulaspota globosa*, *Candida intermedia* e *Rhodotorula mucilaginosa* (ROSA et al., 2011).

5.2. Seleção de linhagens com potencial para produção de AIA

Todos os isolados de levedura obtidos apresentaram resultado positivo para produção de AIA, através da mudança da cor do meio de cultivo para rosa-avermelhado após adição do reagente de Salkowsky (Figura 2).

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. (A) – resultado na presença dos isolados de levedura; (B) – amostras controle, meio de cultivo sem levedura.



Os resultados mostram que o isolado da linhagem de levedura 6S01 apresentou maior produção de AIA (coloração rosa-avermelhado intensa) (Figura 2 – A). Esta linhagem foi selecionada para os testes seguintes; por isso foi enviada para identificação, através de técnicas de biologia molecular. Os resultados mostraram que esta linhagem pertence à espécie *Torulaspota globosa* (ANEXO I).

A espécie *T. globosa* apresenta, como principais características, células esféricas e elipsoidais, com múltiplas gemas ligadas a uma célula mãe. O gênero *Torulaspota* apresenta boa capacidade fermentativa, com baixa produção de acidez volátil. Esse gênero é relacionado ao gênero *Saccharomyces* e *Zygosaccharomyces*. A primeira estirpe do gênero foi descrita como *Saccharomyces delbrueckii* por Lindner em 1895. Em 1904, Lindner estabeleceu um novo gênero, *Torulaspota*, e transferiu a *S. delbrueckii* para *Torulaspota delbrueckii* (VAN DER WALT, 1970). Na terceira e quarta

versões de “As leveduras, um estudo taxonômico” (KREGER-VAN RIJ, 1984; KURTZMAN & FELL, 1998), o gênero *Torulaspota* acomodou mais três espécies: *T. delbrueckii*, *T. globosa* e *T. pretoriensis* (YARROW, 1984; KURTZMAN, 1998). Há relatos de isolamento da espécie *T. globosa* de solo, de início de fermentações, de fezes de seres humanos e da dieta entomófaga à base de carne estragada (KURTZMAN, 1998; VAUGHAN-MARTINI et al. 1999; BARNETT et al. 2000; LIMTONG et al. 2002, INGLIS & COHEN, 2004).

A linhagem 6S01 de *T. globosa* foi, portanto, selecionada para os ensaios de avaliação da influência de diferentes fatores na produção de AIA. Na literatura, esta mesma espécie de levedura (linhagem DMKU-RP31) foi isolada por Nutaratat et. al (2014) de folhas de arroz na Tailândia, apresentando como principais características, capacidade para produção de AIA e antagonismo contra patógenos de plantas, através da produção de compostos voláteis antifúngicos.

Existem resultados na literatura de produção de AIA por outras leveduras isoladas da rizosfera, indicando que esta, provavelmente, é uma característica comum de muitas espécies de levedura; um isolado da espécie *Meyerozyma guilliermondii* isolado por Limtong & Koowadjanakul (2012), em cultivo em meio YEPD, complementado com triptofano, produziu 68,1 µg/mL de AIA após 7 dias de cultivo. El-Tarabily (2004) também obteve uma produção de 31,7 µg/mL por um isolado de *Trichosporon asahii* nas mesmas condições.

5.3. Avaliação dos fatores envolvidos na produção de AIA, na variação do pH do meio e no crescimento celular de *Torulaspota globosa* (6S01) através de planejamento experimental com análise multivariada

5.3.1. Produção de AIA

Foram realizados 19 ensaios com diferentes combinações dos 5 fatores avaliados, descritos anteriormente nas Tabelas 1 e 2. As condições detalhadas para cada um destes ensaios, e os resultados de produção de AIA após 24 e 48 horas de incubação (momentos de máxima produção), estão delineadas na Tabela 4.

Os resultados apresentaram-se diferentes para cada ensaio (Figura 3, 4, 5 e 6). Podemos observar que as maiores produções foram observadas nos ensaios 2, 12 e 14, com produção máxima maior que 200 µg/mL; nos ensaios 3, 8 e 10 as produções se apresentaram acima de 100 µg/mL; os demais ensaios apresentaram produções inferiores a 100 µg/mL de AIA.

Tabela 4 – Produção de AIA por *T. globosa* (6S01) nos ensaios com análise multivariada.

	Fatores avaliados					Variável resposta	
	pH inicial do meio	Temperatura	Agitação	Glicose	Nitrato de Amônio	AIA µg/ml (24h)	AIA µg/ml (48h)
Ensaio 1	3	25° C	100 rpm	10 g/L	15 g/L	44,99 µg/mL	32,16 µg/mL
Ensaio 2	7	25° C	100 rpm	10 g/L	5 g/L	102,96 µg/mL	206,32 µg/mL
Ensaio 3	3	35° C	100 rpm	10 g/L	5 g/L	0,00 µg/mL	161,72 µg/mL
Ensaio 4	7	35° C	100 rpm	10 g/L	15 g/L	39,50 µg/mL	40,92 µg/mL
Ensaio 5	3	25° C	200 rpm	10 g/L	5 g/L	0,00 µg/mL	1,45 µg/mL
Ensaio 6	7	25° C	200 rpm	10 g/L	15 g/L	45,79 µg/mL	50,12 µg/mL
Ensaio 7	3	35° C	200 rpm	10 g/L	15 g/L	37,38 µg/mL	11 98 µg/mL
Ensaio 8	7	35° C	200 rpm	10 g/L	5 g/L	190,92 µg/mL	55,35 µg/mL
Ensaio 9	3	25° C	100 rpm	30 g/L	5 g/L	41,36 µg/mL	91,45 µg/mL
Ensaio 10	7	25° C	100 rpm	30 g/L	15 g/L	0,00 µg/mL	142,25 µg/mL
Ensaio 11	3	35° C	100 rpm	30 g/L	15 g/L	0,00 µg/mL	59,77 µg/mL
Ensaio 12	7	35° C	100 rpm	30 g/L	5 g/L	0,48 µg/mL	202,07 µg/mL
Ensaio 13	3	25° C	200 rpm	30 g/L	15 g/L	10,12 µg/mL	0,00 µg/mL
Ensaio 14	7	25° C	200 rpm	30 g/L	5 g/L	217,73 µg/mL	131,63 µg/mL
Ensaio 15	3	35° C	200 rpm	30 g/L	5 g/L	13,93 µg/mL	0,00 µg/mL
Ensaio 16	7	35° C	200 rpm	30 g/L	15 g/L	28,97 µg/mL	15,35 µg/mL
Ensaio 17	5	30° C	150 rpm	20 g/L	10 g/L	85,08 µg/mL	43,66 µg/mL
Ensaio 18	5	30° C	150 rpm	20 g/L	10 g/L	96,23 µg/mL	38,88 µg/mL
Ensaio 19	5	30° C	150 rpm	20 g/L	10 g/L	79,42 µg/mL	47,65 µg/mL

Figura 3 – Produção de AIA a partir da combinação dos fatores (**Ensaio 1** – pH inicial 3, 25° C, 100 rpm, 10 g/L Glicose, 15 g/L Nitrato de Amônio; **Ensaio 2** – pH inicial 7, 25° C, 100 rpm, 10 g/L Glicose, 5 g/L Nitrato de Amônio; **Ensaio 3** – pH inicial 3, 35° C, 100 rpm, 10 g/L Glicose, 5 g/L Nitrato de Amônio; **Ensaio 4** – pH inicial 7, 35° C, 100 rpm, 10 g/L Glicose, 15 g/L Nitrato de Amônio; **Ensaio 5** – pH inicial 3, 25° C, 200 rpm, 10 g/L Glicose, 5 g/L Nitrato de Amônio).

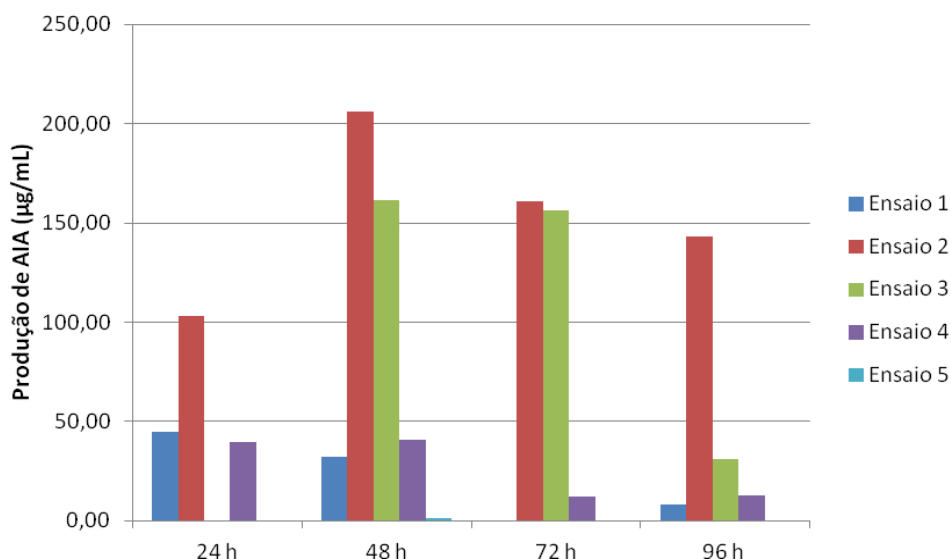


Figura 4 – Produção de AIA a partir da combinação dos fatores (**Ensaio 6** – pH inicial 7, 25° C, 200 rpm, 10 g/L Glicose, 15 g/L Nitrato de Amônio; **Ensaio 7** – pH inicial 3, 35° C, 200 rpm, 10 g/L Glicose, 15 g/L Nitrato de Amônio; **Ensaio 8** – pH inicial 7, 35° C, 200 rpm, 10 g/L Glicose, 5 g/L Nitrato de Amônio; **Ensaio 9** – pH inicial 3, 25° C, 100 rpm, 30 g/L Glicose, 5 g/L Nitrato de Amônio; **Ensaio 10** – pH inicial 7, 25° C, 100 rpm, 30 g/L Glicose, 15 g/L Nitrato de Amônio).

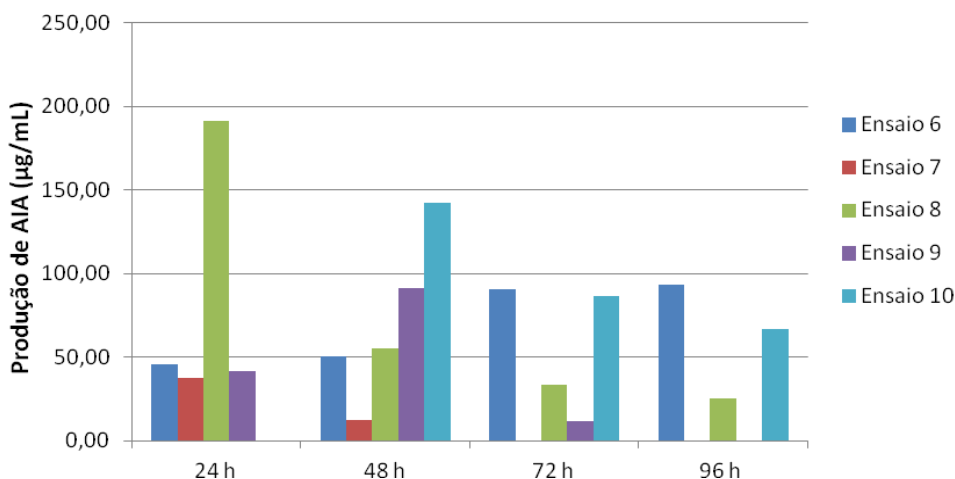


Figura 5 – Produção de AIA a partir da combinação dos fatores (**Ensaio 11** – pH inicial 3, 35° C, 100 rpm, 30 g/L Glicose, 15 g/L Nitrato de Amônio; **Ensaio 12** – pH inicial 7, 35° C, 100 rpm, 30 g/L Glicose, 5 g/L Nitrato de Amônio; **Ensaio 13** – pH inicial 3, 25° C, 200 rpm, 30 g/L Glicose, 15 g/L Nitrato de Amônio; **Ensaio 14** – pH inicial 7, 25° C, 200 rpm, 30 g/L Glicose, 5 g/L Nitrato de Amônio; **Ensaio 15** – pH inicial 3, 35° C, 200 rpm, 30 g/L Glicose, 5 g/L Nitrato de Amônio).

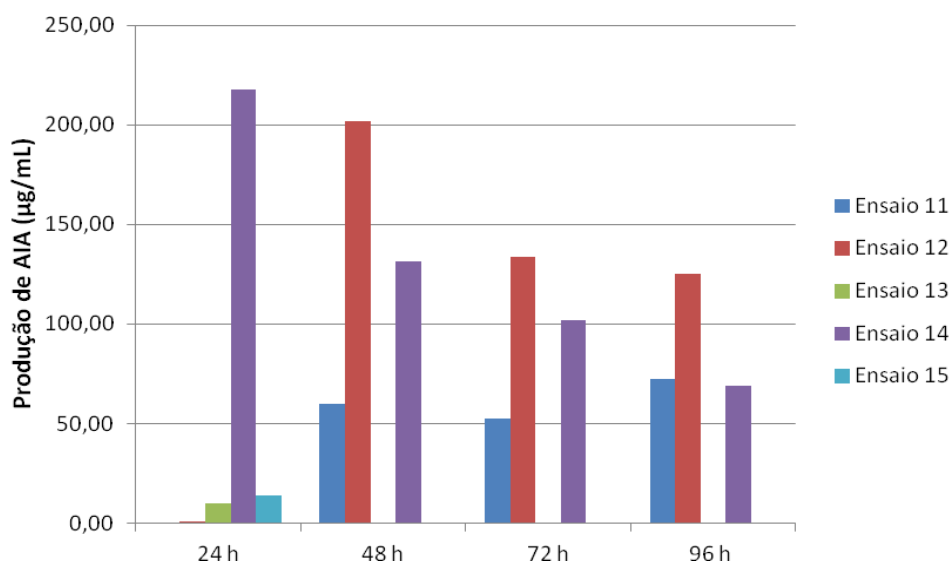
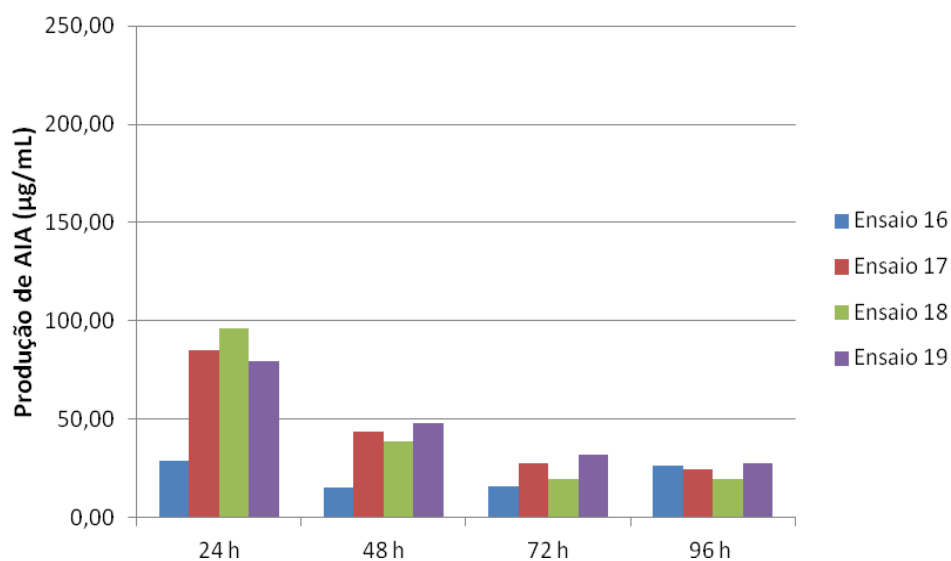


Figura 6 – Produção de AIA a partir da combinação dos fatores (**Ensaio 16** – pH inicial 7, 35° C, 200 rpm, 30 g/L Glicose, 15 g/L Nitrato de Amônio; **Ensaio 17, 18 e 19** – pH inicial 5, 30° C, 150 rpm, 20 g/L Glicose, 10 g/L Nitrato de Amônio).



É possível observar que os ensaios com melhor produção de AIA (ensaios 2, 12 e 14) apresentavam meio de cultura com pH inicial ajustado para 7; outra característica apresentada por estes ensaios a menor quantidade da fonte de nitrogênio (5 g/L de nitrato de amônio) adicionada ao meio.

Observou-se produções medianas, com valores que variavam de 100 µg/mL até 200 µg/mL, no ensaio 3, com 161,72 µg/mL em 48 horas, no ensaio 8, com 190,92 µg/mL em 24 horas e no ensaio 10, com 142,25 µg/mL em 48 horas. Todos estes ensaios também foram ajustados para pH inicial 7.

Na maioria dos ensaios é possível notar uma queda na produção de AIA no meio de cultivo após o pico de produção (24 ou 48 horas). Essa queda pode ser explicada pelo consumo de AIA pela levedura. 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 as 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).

A análise de regressão múltipla mostrou que, dentre os fatores avaliados, os que tiveram uma influência significativa no processo foram pH, agitação e nitrogênio (ANEXO II).

Neste experimento o fator pH apresentou alta influência na produção de AIA em todos os tempos de amostragem (24, 48, 72 e 96 horas), sendo que o melhor resultado obtido foi quando o pH inicial do meio de cultura foi ajustado para 7. A agitação afetou significativamente a produção nos tempos de amostragem de 48 e 72 horas de incubação; a quantidade de nitrogênio no meio influencia significativamente a produção após 48 horas de cultivo.

5.3.2. Variação do pH do meio de cultivo

A variação do pH nos diferentes ensaios pode ser observada nas Figuras 7, 8, 9 e 10. É importante lembrar que o pH inicial do meio foi uma das

variáveis dependentes consideradas, sendo que o pH inicial do meio foi ajustado para pH 7, 5 ou 3, de acordo com o ensaio.

É possível observar que assim que o AIA começa a ser liberado no meio de cultivo o pH do meio tem uma queda, como por exemplo no ensaio 3, onde com 24 horas não há produção de AIA o pH sobe, mas com 48 horas o AIA começa a ser liberado e o pH cai. Todos os ensaios apresentam queda no pH em algum momento, alguns com quedas maiores como os ensaios 4, 8, 12 e 16 e outros com quedas menores como 1, 7, 9 e 15.

Inúmeros fatores ambientais, incluindo valor de pH, podem influenciar na biossíntese de AIA (SPAEPEN et al., 2007). Strzelczyk et al. (1992) informou que fungos micorrízicos realizam a biossíntese da auxina em pH numa faixa de 6 a 9. Resultados semelhantes foram observados para os fungos *Pleurotus ostreatus* (BOSE et al., 2013) e *Nectria pterospermi* (YU et al., 1970). Além disso, há estudos que mostram que a produção de AIA é influenciada pelo valor do pH do meio; Sun et al. (2014) observou em seus estudos que 6 de 12 isolados de levedura testadas produziu baixos níveis de AIA, 5 isolados produziram níveis semelhantes de AIA, e um isolado produziu níveis elevados de AIA em um ambiente ácido; nenhum isolado conseguiu produzir AIA em ambiente alcalino (pH 9). Uma vez que os valores de pH influenciam diretamente o crescimento celular, ele sugeriu que a liberação de AIA no meio pode ser a principal causa de diminuição do pH, sendo a acumulação de AIA diretamente proporcional à queda do pH (SUN et al., 2014).

Isso se dá devido a produção de ácidos orgânicos ou liberação de íons H⁺ (ARCAND & SCHNEIDER, 2006), sendo este, inclusive, um possível mecanismo de solubilização de fosfato. Na literatura é possível encontrar relatos de isolados da espécie *Meyerozyma guilliermondii* que apresentam capacidade de solubilização de fosfato inorgânico em ensaios em meio de cultura sólido e líquido, além de apresentar redução do pH do meio de cultura ao mesmo tempo em que ocorreu a solubilização de fosfato (NAKAYAN et al., 2013).

Figura 7 – Variação do pH do meio de cultura (**Ensaio 1** - pH inicial 3, 25° C, 100 rpm, 10 g/L Glicose, 15 g/L Nitrato de Amônio; **Ensaio 2** - pH inicial 7, 25° C, 100 rpm, 10 g/L Glicose, 5 g/L Nitrato de Amônio; **Ensaio 3** – pH inicial 3, 35° C, 100 rpm, 10 g/L Glicose, 5 g/L Nitrato de Amônio; **Ensaio 4** – pH inicial 7, 35° C, 100 rpm, 10 g/L Glicose, 15 g/L Nitrato de Amônio; **Ensaio 5** - pH inicial 3, 25° C, 200 rpm, 10 g/L Glicose, 5 g/L Nitrato de Amônio).

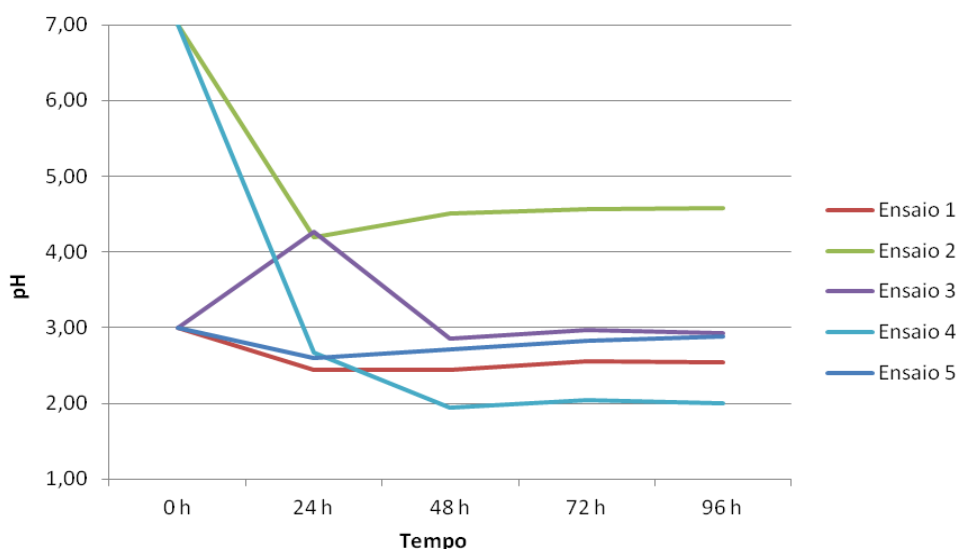


Figura 8 - Variação do pH do meio de cultura (**Ensaio 6** – pH inicial 7, 25° C, 200 rpm, 10 g/L Glicose, 15 g/L Nitrato de Amônio; **Ensaio 7** – pH inicial 3, 35° C, 200 rpm, 10 g/L Glicose, 15 g/L Nitrato de Amônio; **Ensaio 8** – pH inicial 7, 35° C, 200 rpm, 10 g/L Glicose, 5 g/L Nitrato de Amônio; **Ensaio 9** – pH inicial 3, 25° C, 100 rpm, 30 g/L Glicose, 5 g/L Nitrato de Amônio; **Ensaio 10** – pH inicial 7, 25° C, 100 rpm, 30 g/L Glicose, 15 g/L Nitrato de Amônio).

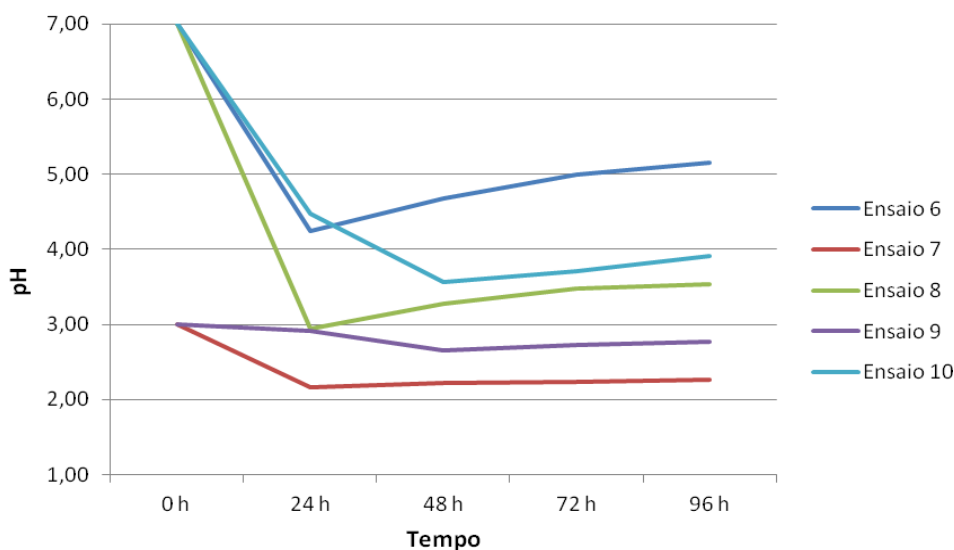


Figura 9 - Variação do pH do meio de cultura (**Ensaio 11** – pH inicial 3, 35° C, 100 rpm, 30 g/L Glicose, 15 g/L Nitrato de Amônio; **Ensaio 12** – pH inicial 7, 35° C, 100 rpm, 30 g/L Glicose, 5 g/L Nitrato de Amônio; **Ensaio 13** – pH inicial 3, 25° C, 200 rpm, 30 g/L Glicose, 15 g/L Nitrato de Amônio; **Ensaio 14** – pH inicial 7, 25° C, 200 rpm, 30 g/L Glicose, 5 g/L Nitrato de Amônio; **Ensaio 15** – pH inicial 3, 35° C, 200 rpm, 30 g/L Glicose, 5 g/L Nitrato de Amônio).

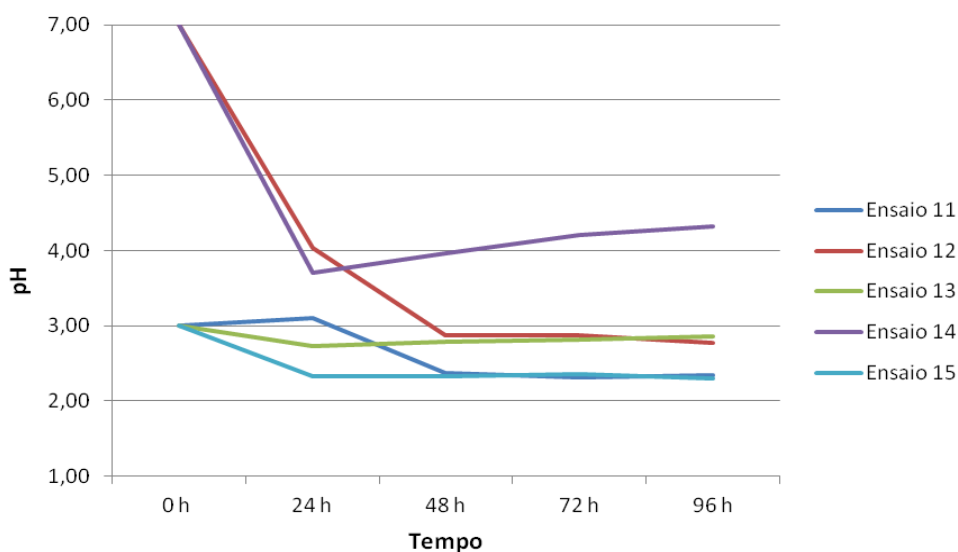
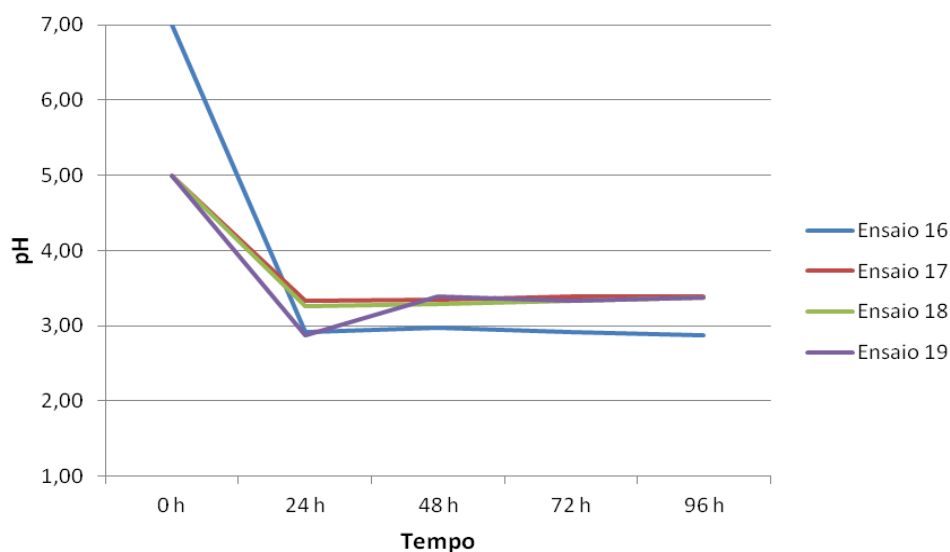


Figura 10 - Variação do pH do meio de cultura (**Ensaio 16** – pH inicial 7, 35° C, 200 rpm, 30 g/L Glicose, 15 g/L Nitrato de Amônio; **Ensaio 17, 18 e 19** – pH inicial 5, 30° C, 150 rpm, 20 g/L Glicose, 10 g/L Nitrato de Amônio).



5.3.3. Crescimento celular

Os resultados mostram que houve ensaios em que se alcançou a fase estacionária após 24 horas de incubação, e outros após 48 horas (Figura 11, 12, 13 e 14). Podemos observar que o ensaio 8 (pH 7, 35° C, 200 rpm, 10 g/L glicose, 5 g/L nitrato de amônio) obteve um maior crescimento celular se comparado aos outros ensaios (Figura 13).

Todos os ensaios foram inoculados com 5×10^4 células de levedura/ml de meio. Os ensaios que tiveram início da fase estacionária até 24 horas, foram os 2, 5, 6, 8, 13, 15, 16, 17, 18 e 19, enquanto os outros tiveram início após 48 horas (Ensaio 1, 3, 4, 9, 10, 11, 12 e 14).

O ensaio 7 apresentou floculação celular, e por isso a contagem do número de células foi impossibilitada. A floculação das células foi provocada, provavelmente, por um processo de autofloculação; floculação de células de levedura podem ocorrer por diferentes motivos, dentre eles a contaminação bacteriana (ESSER & KUES, 1983); no nosso trabalho, como o ensaio consistia em uma cultura pura da levedura, concluímos que se trata de um processo natural, inerente à espécie ou linhagem. Por isso não foi avaliada as causas/estímulos deste fenômeno, que ainda não é bem esclarecido na literatura.

Figura 11 – Crescimento celular da levedura (**Ensaio 1** – pH inicial 3, 25° C, 100 rpm, 10 g/L Glicose, 15 g/L Nitrato de Amônio; **Ensaio 2** – pH inicial 7, 25° C, 100 rpm, 10 g/L Glicose, 5 g/L Nitrato de Amônio; **Ensaio 3** – pH inicial 3, 35° C, 100 rpm, 10 g/L Glicose, 5 g/L Nitrato de Amônio; **Ensaio 4** – pH inicial 7, 35° C, 100 rpm, 10 g/L Glicose, 15 g/L Nitrato de Amônio; **Ensaio 5** – pH inicial 3, 25° C, 200 rpm, 10 g/L Glicose, 5 g/L Nitrato de Amônio).

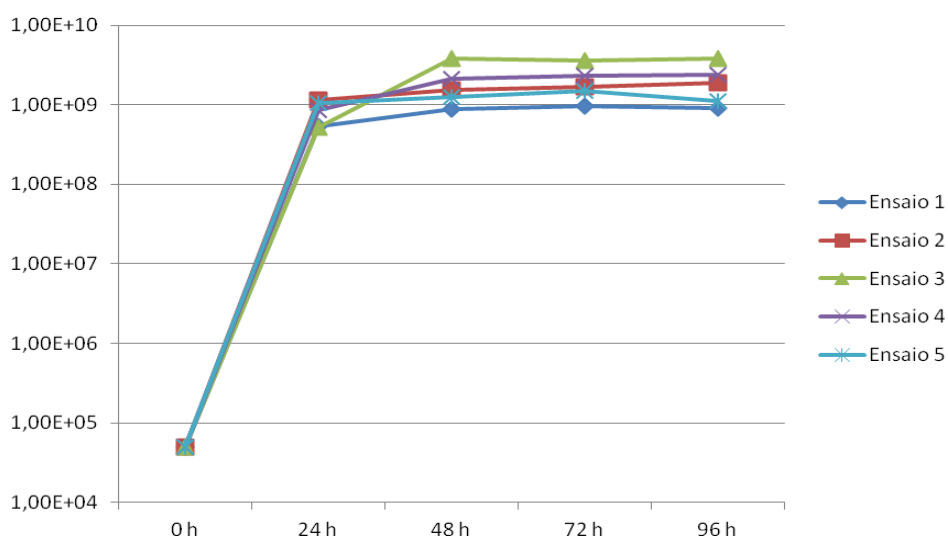


Figura 12 - Crescimento celular da levedura (**Ensaio 6** – pH inicial 7, 25° C, 200 rpm, 10 g/L Glicose, 15 g/L Nitrato de Amônio; **Ensaio 7** – pH inicial 3, 35° C, 200 rpm, 10 g/L Glicose, 15 g/L Nitrato de Amônio; **Ensaio 8** – pH inicial 7, 35° C, 200 rpm, 10 g/L Glicose, 5 g/L Nitrato de Amônio; **Ensaio 9** – pH inicial 3, 25° C, 100 rpm, 30 g/L Glicose, 5 g/L Nitrato de Amônio; **Ensaio 10** – pH inicial 7, 25° C, 100 rpm, 30 g/L Glicose, 15 g/L Nitrato de Amônio). *Ensaio 7: Houve floculação da levedura, impedindo a contagem das células.

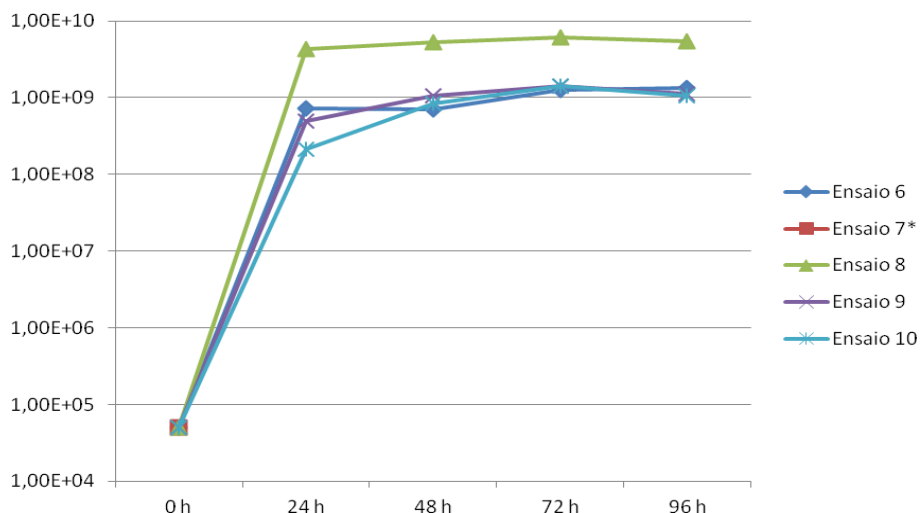


Figura 13 – Crescimento celular da levedura (**Ensaio 11** – pH inicial 3, 35° C, 100 rpm, 30 g/L Glicose, 15 g/L Nitrato de Amônio; **Ensaio 12** – pH inicial 7, 35° C, 100 rpm, 30 g/L Glicose, 5 g/L Nitrato de Amônio; **Ensaio 13** – pH inicial 3, 25° C, 200 rpm, 30 g/L Glicose, 15 g/L Nitrato de Amônio; **Ensaio 14** – pH inicial 7, 25° C, 200 rpm, 30 g/L Glicose, 5 g/L Nitrato de Amônio; **Ensaio 15** – pH inicial 3, 35° C, 200 rpm, 30 g/L Glicose, 5 g/L Nitrato de Amônio).

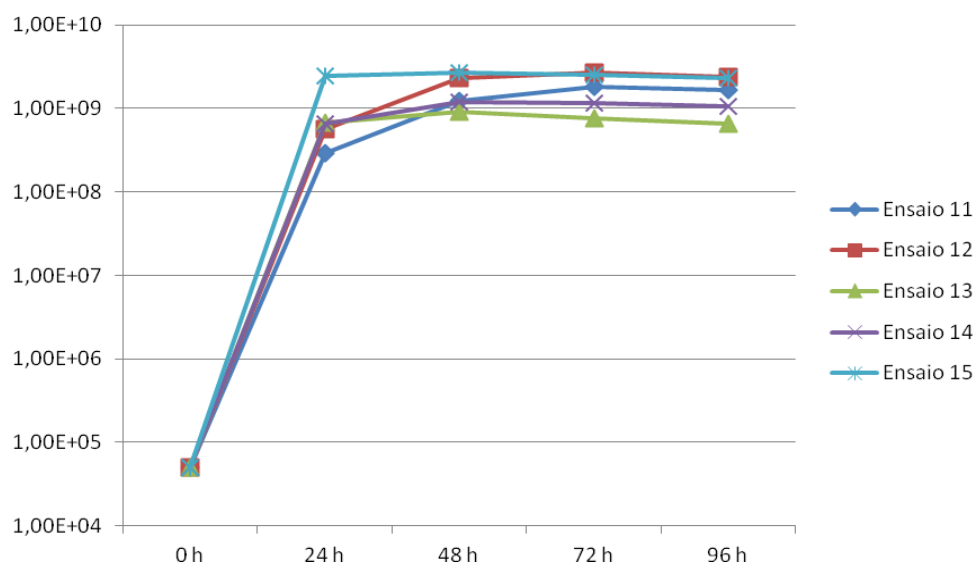
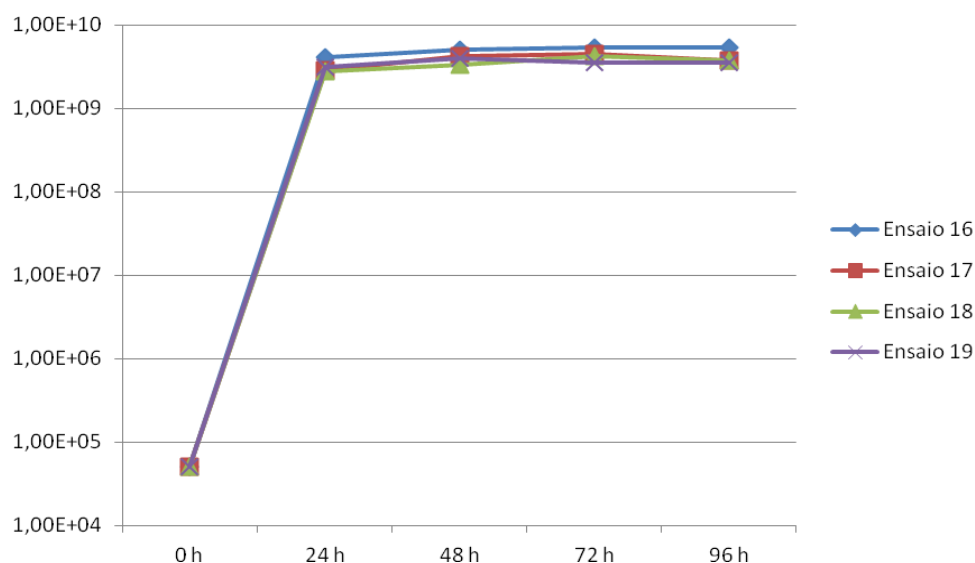


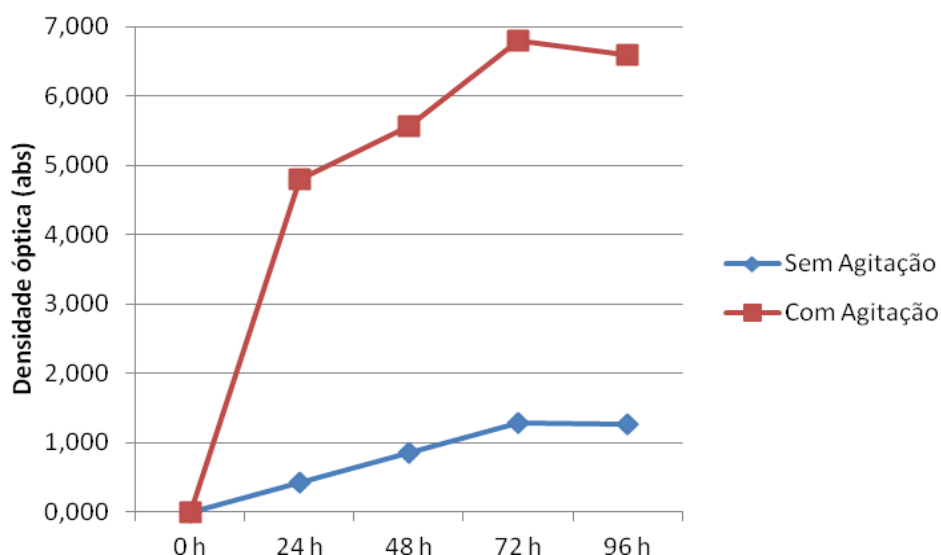
Figura 14 - Crescimento celular da levedura (**Ensaio 16** – pH inicial 7, 35° C, 200 rpm, 30 g/L Glicose, 15 g/L Nitrato de Amônio; **Ensaio 17, 18 e 19** – pH inicial 5, 30° C, 150 rpm, 20 g/L Glicose, 10 g/L Nitrato de Amônio).



5.4. Influência da agitação do cultivo em meio líquido de *T. globosa* (6S01) na produção de AIA, variação do pH e crescimento celular

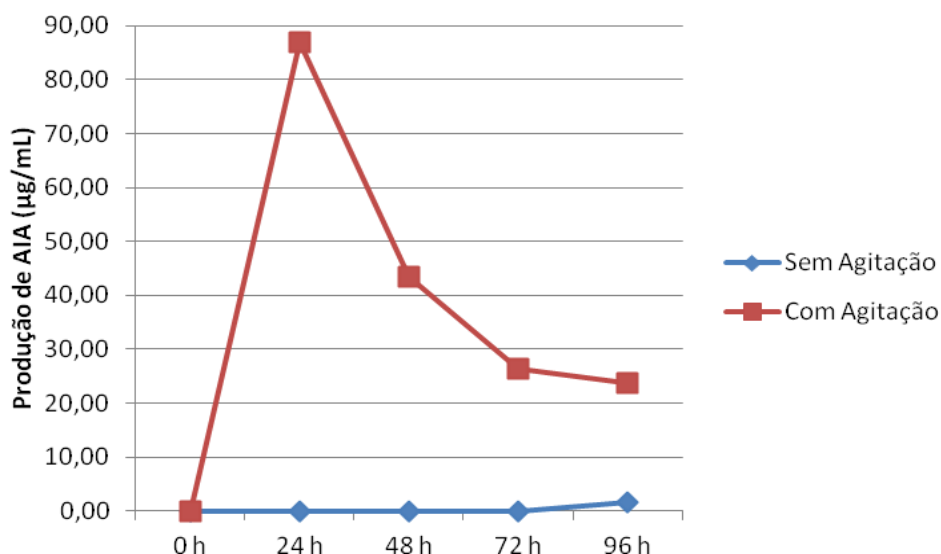
Os resultados mostram que sem a agitação do meio há grande prejuízo no crescimento celular (Figura 15); este dado é esperado, pois a falta de oxigenação no meio de cultivo promove a mudança metabólica das células na produção de energia, de respiração para fermentação. A produção energética na fermentação fica restringida à glicólise, que sintetiza apenas 2 moléculas de ATP (Adenosina Trifosfato) por molécula de glicose oxidada. Com menos energia há menor reprodução das células.

Figura 15 - Comparação do crescimento celular em cultivo com e sem agitação (dados em absorbância a 600 nm).



Os resultados de crescimento celular parecem se refletir na produção de AIA, que é praticamente inexistente na ausência de agitação (Figura 16); a presença de oxigênio no meio parece ser imprescindível para que a levedura seja capaz de produzir AIA. Mas a quantidade de oxigênio necessária para a produção, talvez não deva ser grande, considerando que o experimento anterior mostrou que a agitação é um fator com ação significativa na produção de AIA, e que a menor velocidade de agitação (100 rpm) favoreceu o processo.

Figura 16 – Comparação da produção de AIA em cultivo com e sem agitação.

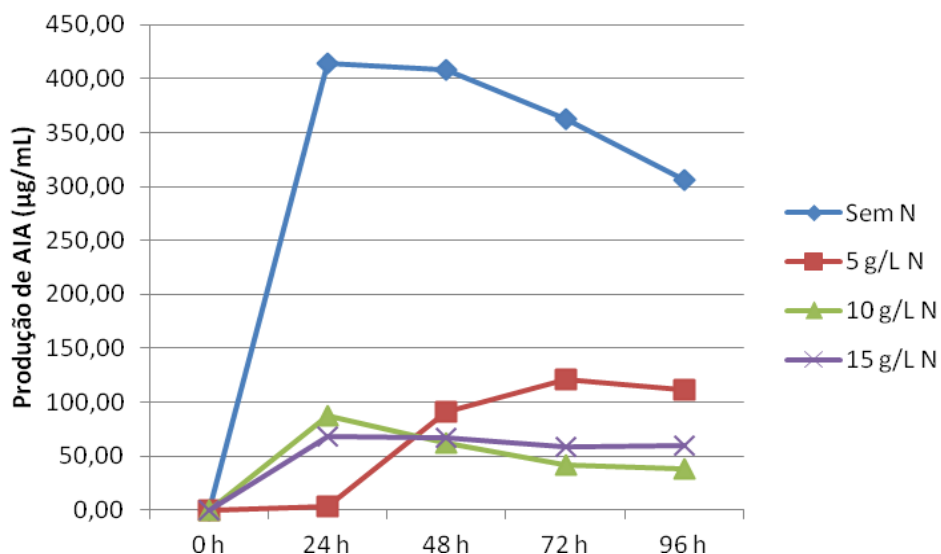


5.5. Influência da fonte de N na produção de AIA por *T. globosa* (6S01)

Nos resultados foi observado que a não adição de nitrato de amônia no meio de cultivo proporcionou a maior produção de AIA (Figura 17); a conclusão que obtivemos com este resultado foi de que a adição de nitrato de amônia (fonte de nitrogênio) causa a diminuição da absorção de triptofano pelas células da levedura, que o utilizam como fonte do nutriente, na ausência de outra. Como o aminoácido é precursor de AIA, com o aumento da sua absorção, há também o aumento da produção do ácido.

O tratamento sem adição de nitrato de amônia, apesar de proporcionar alta produção de AIA, causou uma maior degradação/consumo de AIA, após o pico de produção (24 horas), se comparado aos tratamentos com adição da fonte de nitrogênio.

Figura 17 – Comparação da produção de AIA perante diferentes quantidades de nitrogênio no meio de cultivo.



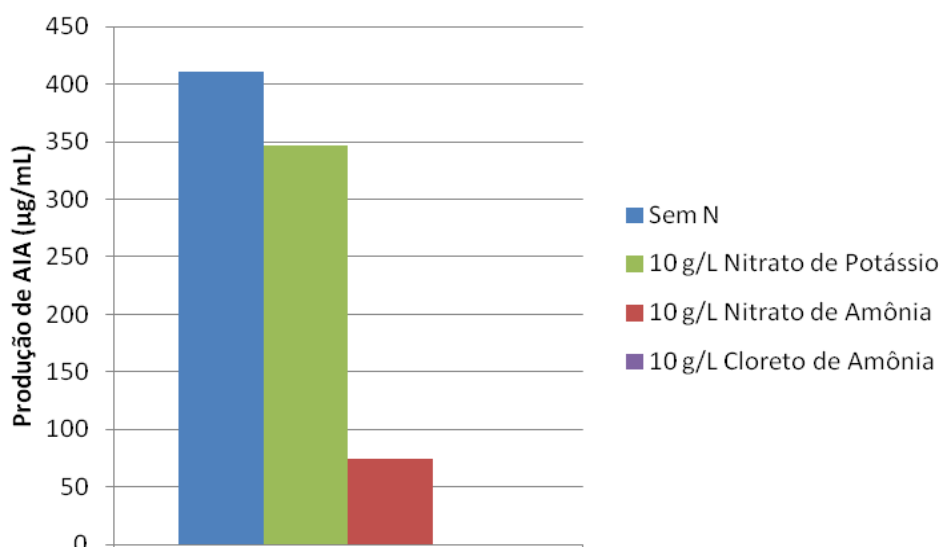
Há relatos na literatura de que a adição de nitrato de amônio como fonte de nitrogênio tem um forte efeito de inibição no uso do triptofano. Muhammad et al. (1992) observou que houve uma queda na produção de AIA quando se adicionava nitrato de amônio no meio de cultivo. Uma resposta similar com a adição de sulfato de amônia foi observada também por Narayanaswami e Veerajau (1969).

Sridevi e Mallaiah (2007) estudaram o efeito de diferentes fontes de nitrogênio em isolados de *Rhizobium* em meio YEM (*yeast extract mineral*) suplementado com triptofano e revelou que adição de nitrato de potássio (KNO_3) aumentou a produção de AIA. Nutaratat et. al (2014) realizou um estudo com um isolado da levedura vermelha *Rhodospiridium paludigenum*, em que a adição de KNO_3 no meio também favoreceu a produção de AIA, que alcançou a concentração de 257,9 µg/ml.

Considerando os resultados obtidos, e as informações na literatura, avaliamos a produção de AIA com a adição de três diferentes fontes de nitrogênio: Nitrato de Amônia (NH_4) (NO_3), Nitrato de Potássio (KNO_3) e o Cloreto de Amônia (NH_4Cl).

Os resultados obtidos mostram que a ausência de fonte de nitrogênio ainda proporciona maior produção de AIA, se comparado à adição das fontes testadas (Figura 18).

Figura 18 – Produção de AIA com adição ou não de diferentes fontes de N, após 36 horas de incubação.



É possível notar uma melhor produção de AIA na presença de nitrato de potássio em relação à nitrato de amônia. A adição de cloreto de amônia, por sua vez, apresentou uma produção muito baixa de AIA. Nutaratat et al. (2014) obteve um resultado similar para produção de AIA por um isolado da espécie *Rhodosporidium paludigenum* quando utilizou cloreto de amônia no meio de cultivo.

É possível observar pela análise estatística que não há diferença significativa entre o tratamento sem N e com nitrato de potássio (Tabela 5).

Tabela 5 – Produção de AIA sob o fornecimento de diferentes fontes de N no meio.

Fonte de N	Produção de AIA (µg/ml)	
Cloreto de Amônia	0,0000	a*
Nitrato de Amônia	62,5428	a
Nitrato de Potássio	346,5251	b
Sem N	407,8525	b

*Letras diferentes indicam diferença significativa ao nível de 5%.

5.6. Avaliação da produção de AIA por *T. globosa* (6S01) em meio sem adição de triptofano

Os resultados mostraram que *T. globosa* não apresenta produção de AIA em meio de cultura sem adição de triptofano, sendo este aminoácido, portanto, o precursor da produção deste ácido por esta espécie de levedura. As plantas têm múltiplas vias para sintetizar, inativar e catabolizar AIA (DELKER et al. 2008; LAU et al. 2008; NORMANLY, 2009). Dentre essas vias existem dois caminhos principais para a biossíntese de AIA: dependente de triptofano e independente de triptofano. A produção de AIA dependente de triptofano tem sido intensivamente estudada em bactérias (CARRENO-LOPEZ et al. 2000; KUMAVATH et al. 2010; MUJAHID et al. 2011; SZKOP e BIELAWSKI, 2013). No caso das leveduras, poucos estudos foram conduzidos.

Existem trabalhos na literatura que indicam que isolados de *M. guilliermondii*, *Rh. mucilaginosa* e *M. caribbica* foram capazes de produzir pequenas concentrações (3 µg/mL de AIA) na ausência do triptofano (NAKAYAN et al., 2013). Na maioria dos estudos, porém a presença do triptofano é necessária.

Nassar et al. (2005) avaliaram a produção de AIA por 24 isolados de levedura, na presença e ausência de triptofano; todos os isolados produziram AIA apenas na presença do aminoácido. Nutaratat et al. (2016) estudaram rotas biossintéticas para produção de AIA com um isolado de levedura vermelha da espécie *Rhodospiridium paludigenum* (DMKU-RP301) que se mostrou dependente de triptofano para produção de AIA, usando a rota do ácido indolpirúvico como intermediário.

Rao et al. (2010) estudaram rotas biossintéticas de produção de AIA em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e propôs que essa levedura faz parte das dependentes de triptofano para produção de AIA, através da rota do ácido indolpirúvico como intermediário. Além disso, eles também encontraram um caminho independente do triptofano para biossíntese de AIA por essa levedura. No processo de caracterização de mutantes numa síntese de AIA dependente de triptofano, eles descobriram outro caminho que não depende de triptofano exógeno para a biossíntese do ácido.

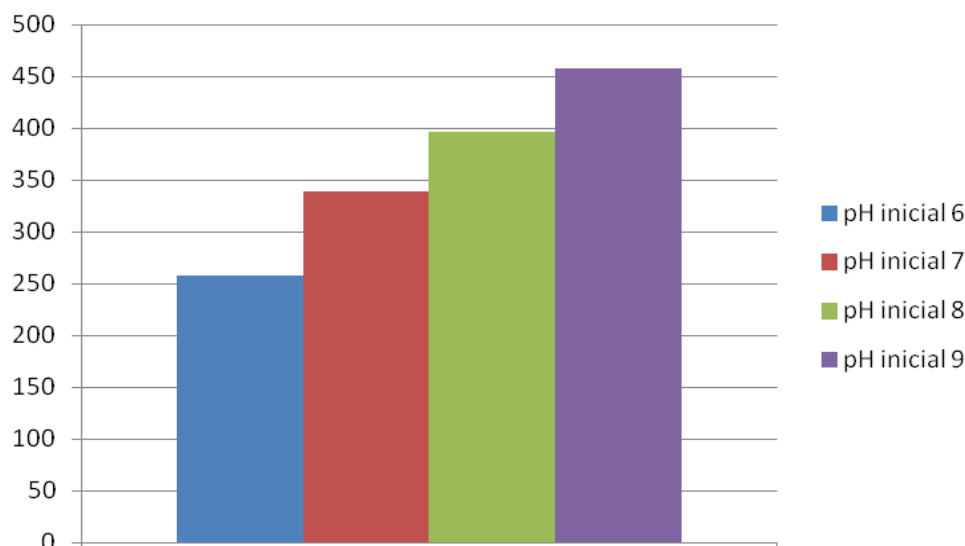
O caminho independente de triptofano de AIA tem sido demonstrado em várias espécies de plantas, mas seus intermediários, etapas intermediárias e genes envolvidos nessa via ainda permanecem indefinidos (WOODWARD E BARTEL, 2005; NORMANLY, 2009). A coexistência de ambas as vias de biossíntese de AIA triptofano dependentes e triptofano independentes tem sido documentada em plantas (PRNSEN et al. 1993) e em micro-organismos (NORMANLY et al. 2004; WOODWARD E BARTEL, 2005). Em plantas, a síntese de AIA independente de triptofano é proposta para se ramificar a partir de fosfato de indol ou de glicerol de indol, ambos precursores do triptofano (NORMANLY et al. 2004).

Há precedência para múltiplas vias de biossíntese de AIA em micro-organismos, particularmente bactérias associadas a plantas (CLARK et al. 1993; COSTACURTA E VANDERLEYDEN, 1995; GLICK et al. 1999; LAMBRECHT et al. 2000). Reineke et al. (2008) observaram que enquanto a enzima aldeído desidrogenase tem sido implicada na síntese de AIA em *Ustilago maydis*, esta via não está envolvida na tumorigênese. Este resultado é consistente com o trabalho de Rao et al. (2010) que observaram que ALD2 e ALD3 não são necessários para síntese de AIA induzir filamentação e que um caminho alternativo de AIA provavelmente existe para levedura.

5.7. Avaliação da produção de AIA por *T. globosa* (6S01) em meio com diferentes valores de pH inicial do meio

Os resultados obtidos mostram que há uma correlação positiva entre o aumento do pH inicial do meio e a produção de AIA pela levedura (Figura 19). Este resultado está de acordo com o experimento de análise multivariada, que mostrou ser o pH inicial 7 (o mais alto) o que proporcionou maior produção de AIA.

Há trabalhos na literatura que relacionam o pH com a produção de hormônios promotores de crescimento em plantas, como as auxinas, sendo essa produção favorecida sob condições alcalinas (TOYOMASU et al., 1993; SANDBERG et al., 1993) como foi observado neste trabalho.

Figura 19 – Produção de AIA após 36 horas em diferentes níveis de pH inicial.

Foi observado que na literatura há poucos artigos atuais sobre o assunto, sendo difícil encontrar trabalhos para comparar os resultados obtidos neste experimento. Sendo assim, os testes realizados mostraram que quando os valores iniciais de pH são alcalinos há uma maior produção de AIA e que estes resultados são novidades na literatura.

Tabela 6 – Crescimento celular após 36 horas em diferentes níveis de pH inicial.

pH inicial	Crescimento Celular	
6	3,98E+09	a*
7	3,99E+09	a
8	3,62E+09	a
9	3,42E+09	a

*Letras diferentes indicam diferença significativa ao nível de 5%.

Outro resultado importante obtido neste experimento foi o crescimento da levedura nos diferentes valores de pH do meio. Notou-se que o crescimento é igual e não varia nos diferentes valores de pH (Tabela 6), mostrando que a levedura é resistente às variações, de pH e de outros fatores, como visto no experimento de análise multivariada. Esse dado indica que a linhagem apresenta potencial de aplicação industrial ou agrícola.

6. CONCLUSÕES

- Foram isoladas 6 (seis) linhagens de leveduras de rizosfera de milho e cana-de-açúcar, sendo que todas foram capazes de produzir AIA *in vitro*, com adição de triptofano no meio;
- A linhagem 6S01, identificada como sendo da espécie *Torulaspota globosa* foi selecionada para os ensaios, pois apresentou maior produção de AIA, caracterizada pela formação de coloração rosa intensa após reação com reagente de Salkowsky;
- Nos ensaios que avaliaram variáveis de cultivo na produção de AIA pela levedura, observamos que pH foi o fator com maior influência, sendo este significativo em todos os tempos amostrados;
- Agitação do meio de cultivo e concentração de nitrato de amônio adicionado no meio também apresentaram influência significativa na produção de AIA pela levedura;
- Ausência de agitação causa prejuízo ao desenvolvimento da levedura e impede a produção de AIA;

- Os tratamentos com baixas concentrações da fonte de nitrogênio ou total ausência desta no meio, promoveu maior produção de AIA pela levedura, porém também apresentaram os maiores valores de degradação deste fitohormônio no meio;
- Não há produção de AIA pela levedura quando não há adição de triptofano no meio de cultura;
- O isolado de *T. globosa* (6S01) aumenta a produção de AIA quando do meio de cultura é alcalinizado, sendo que o maior valor de pH avaliado (9,0) foi o que proporcionou maior produção;
- A linhagem possui grande potencial para ser constituinte de produto biológico ou para ser explorado industrialmente, uma vez que nos testes realizados mostrou ser resistente às variações de pH, temperatura, oxigênio, fontes nutricionais.

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, p1-20, 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. **Turk. J. Biol.**, v.29, p.29-34, 2005.
- 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.
- ARTECA, R. Plant Growth Substances: Principles and Applications. New York: Chapman & Hall, 1995.
- AZCÓN-BIETO, J.; TALÓN, M. Fundamentos de Fisiología Vegetal, 2 ed. In: McGraw-Hill/Interamericana de España and Edicions Universitat de Barcelona, 2008.
- AZEREDO, L. A. I. et al. Yeast communities associated with sugarcane in Campos, Rio de Janeiro, Brazil. **International Microbiology**, v.1, p.205-208, 1998.

- BAREA et al. Production of plant growth regulators by rhizosphere phosphate-solubilizing bacteria. **J. Appl. Bacteriol**, v.40, p.129-134, 1976.
- BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. **Yeasts**: Characteristics and Identification, 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2000.
- BASTOS, A. E. R. et al. Salt tolerant phenol-degrading microorganisms isolated from Amazonian soil samples. **Archives of Microbiology**, v.174, p.346-352, 2000.
- 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.
- BIANCO, C.; DEFEZ, R. *Medicago truncatula* improves salt tolerance when nodulated by an indole-3-acetic acid-overproducing *Sinorhizobium meliloti* strain. **J. Exp. Bot.**, 60 (11), p.3097-3107, 2009.
- BISWAS, J.C. et al. Rhizobia inoculation influences seedling vigor and yield of rice. **Agronomy Journal**, v.92, p.880-886, 2000.
- BOSE, A.; SHAH, D.; KEHARIA, H. Production of indole-3-acetic-acid (IAA) by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* under submerged condition of *Jatropha* seedcake. **Mycology**, v.4, p.103-111, 2013.
- BOTHA, A. Yeast in soil. In: ROSA, C. A.; PETER, G. (Eds.), *The Yeast Handbook: Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*, p.221-240, 2006.
- CARREÑO-LOPEZ, R.; CAMPOS-REALES, N.; ELMERICH, C. Physiological evidence for different regulated tryptophan-dependent pathways for indole-3-acetic acid synthesis in *Azospirillum brasilense*. **Molecular and General Genetics**, v.264, p.521-530, 2000.
- CLARK, E. et al. Cloning and characterization of *iaaM* and *iaaH* from *Erwinia herbicola* pathovar *gypsophilae*. **Phytopathology**, v.83, p.234–240, 1993.
- CLELAND, R.E. **Auxin and cell elongation**. In: DAVIES, P.J. (ed) *Plant hormones and their role in plant growth and development*. Kluwer, Dordrecht, p.132–148, 1990.
- CLOETE, K. J. et al. 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.
- COSTACURTA, A.; VANDERLEYDEN, J. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, v.21, p.1-18, 1995.

- DELKER, C., RASCHKE, A.; QUINT, M. Auxin dynamics: the dazzling complexity of a small molecule's message. **Planta**, v.227, p.929–941, 2008.
- DENG, Z. et al. Characterization of heavy metal-resistant endophytic yeast *Cryptococcus* sp. CBSB78 from rapes (*Brassica chinensis*) and its potential in promoting the growth of *Brassica spp.* in metal-contaminated soils. **Water Air and Soil Pollution**, v.223, p.5321-5329, 2012.
- DIMENNA, M.E. The isolation of yeasts from soil. **Journal of General Microbiology**, v.17, p.678–688, 1957.
- DVORNIKOVA, T. P.; SKRIABIN, G. K.; SUVOROV, N. N. Enzymatic transformation of tryptamine by fungi. **Mikrobiologiya**, v.39, p.42-46, 1970.
- 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.
- FAURE, D.; VEREECKE, D.; LEVEAU, J. H. J. Molecular communication in the rhizosphere. **Plant Soil**, v.321, p.279–303, 2009.
- FIALHO, M. B. *Efeito in vitro de Saccharomyces cerevisiae sobre Guignardia citricarpa, agente causal da pinta preta dos citros*. 2004. 69 p. Dissertação de Mestrado – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.
- FLOCH, G. et al. 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.
- GLICK, B. R. et al. Biochemical and Genetic Mechanisms Used by Plant Growth Promoting Bacteria. **Imperial College Press**, London, 1999.
- 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.
- GUIMARÃES, T. M. *Identificação e seleção de cepas de levedura Saccharomyces cerevisiae para elaboração de vinho*. 2005. 101p. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- 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.
- HOYOS-CARVAJAL, L.; ORDUZ, S.; BISSETT, J. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. **Biological Control**, v.51, p.409-416, 2009.
- INGLIS, G. D.; COHEN, A. C. Influence of antimicrobial agents on the spoilage of a meat-based entomophage diet. **J Econ Entomol**, v.97, p.235–250, 2004.
- 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.
- KORRES, A. M. N. et al. *Candida krusei* and *Kloeckera apis* inhibit the causal agent of pineapple fusariosis, *Fusarium guttiforme*. **Fungal Biology**, v.115, p.1251-1258, 2011.
- KREGER-VAN RIJ, N. J. W. The yeasts: a taxonomic study. **Elsevier Science Publishers**, Amsterdam, 1984.
- KUMAVATH, R. N. et al. Production of phenols and alkyl gallate esters by *Rhodobacter sphaeroides* OU5. **Curr Microbiol**, v.60, p.107–111, 2010.
- KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large-subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.73, p.331–371, 1998.
- LAMBRECHT, M. et al. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. **Trends in Microbiol**, v.8, p.298–300, 2000.
- LAST, R.I. et al. Tryptophan mutants in *Arabidopsis* – The consequences of duplicated tryptophan synthase β genes. **Plant Cell**, v.3, p.345-358, 1991.

- LAU, S.; JURGENS, G.; DE SMET, I. The evolving complexity of the auxin pathway. **Plant Cell**, v.20, p.1738–1746, 2008.
- LIMTONG, S. et al. 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.
- LIMTONG, S. Yeast diversity in Thai traditional fermentation starter (Loog-pang). **Nat Sci**, v.36, p.149–158, 2002.
- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. Biology of microorganisms. 8 ed. New Jersey: Prentice Hall, 2000.
- MAOR, R. et al. In planta production of indole-3-acetic acid by *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*. **Applied Environmental Microbiology**, v.70, p.1852–1854, 2004.
- MATSUKAWA, E. et al. Stimulatory effect of indole-3-acetic acid on aerial mycelium formation and antibiotic production in *Streptomyces spp.* **Actinomycetologica**, v.21, p.32-39, 2007.
- MESTRE, C. M. et al. Yeast communities associated with the bulk-soil, rhizosphere and ectomycorrhizosphere of a *Nothofagus pumilio* forest in northwestern Patagonia, Argentina. **FEMS Microbiol Ecol**, v. 78, p. 531–541, 2011.
- MIRABAL, A. L.; KLEINER, D.; ORTEGA, E. Spores of the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* host yeasts that solubilize phosphate and accumulate polyphosphates. **Mycorrhiza**, v.18, p.197–204, 2008.
- MIRZA, M. S. et al. 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.
- MUHAMMAD, S. et al. Tryptophan-dependent biosynthesis of auxins in soil. **Plant and Soil**, v.147, p.207-215, 1992.
- MUJAHID, M. D.; SASIKALA, C. H.; RAMANA, V. Production of indole-3-acetic acid and related indole derivatives from l-tryptophan by *Rubrivivax benzoatilyticus* JA2. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.89, p.1001–1008, 2011.
- MUNDRA, S.; ARORA, R.; STOB DAN, T. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel temperature-, pH-, and salt-tolerant yeast, *Rhodotorula sp.* PS4, isolated from seabuckthorn rhizosphere, growing in cold desert of Ladakh, India. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.27, p.2387-2396, 2011.

- NAKAYAN, P. et al. Phosphate-solubilizing soil yeast *Meyerozyma guilliermondii* CC1 improves maize (*Zea mays* L.) productivity and minimizes requisite chemical fertilization. **Plant Soil**, v.373, p.301-315, 2013.
- NARAYANASWAMI, R.; VEERRAJU, V. IAA synthesis in paddy soil as influenced by ammonium sulfate fertilization. **Curr. Sci.**, v.38, p.517-518, 1969.
- 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.
- NORMANLY, J. Approaching Cellular and Molecular Resolution of Auxin Biosynthesis and Metabolism. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, Cold Spring Harbor, NY, 2009.
- NORMANLY, J.; SOVIN, J.; COHEN, J. D. Auxin metabolism in plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action. Kluwer, Dordrecht, 2004.
- 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. et al. Indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in the basidiomycetous yeast *Rhodospiridium paludigenum*. **Arch Microbiol**, v.198, p.429–437, 2016.
- NUTARATAT, P. et al. Plant growth promoting traits of epiphytic and endophytic yeasts isolated from rice and sugar cane leaves in Thailand. **Fungal Biology**, v.118, p.683-694, 2014.
- PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, v.42, p.207–220, 1996.
- PELCZAR, J. R.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. Microbiologia: conceitos e aplicações. 2 ed. São Paulo: Makron Books, v.1, 1997.
- PLATANIA, C. et al. 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.
- PRETORIUS, I.S.; du TOIT, M.; van RENSBURG, P. Designer yeasts for the fermentation industry of the 21st century. **Food Technol. Biotechnol.** v.41, n.1, p.3-10, 2003.

- PRINSEN, E. et al. *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid biosynthesis: evidence for a non-tryptophan dependent pathway. **Mol Plant-Microbe Interact**, v.6, p.609–615, 1993.
- PRUSTY, R.; GRISAFI, P.; FINK, G. R. The plant hormone indoleacetic acid induces invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.101, p.4153–4157, 2004.
- RAO, R. P. et al. Aberrant synthesis of indole-3-acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae* triggers morphogenic transition, a virulence trait of pathogenic fungi. **Genet Soc Am**, v.185, p.211–220, 2010.
- REINEKE, G. et al. Indole-3-acetic acid (IAA) biosynthesis in the smut fungus *Ustilago maydis* and its relevance for increased IAA levels in infected tissue and host tumour formation. **Mol Plant Pathol**, v.9, p.339-55, 2008.
- RINCÓN, A. et al. 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.
- ROSA, M. M.; TAU-K-TORNISIELO, S. M.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Bioprospection of Yeasts as Biocontrol Agents Against Phytopathogenic Molds. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v.54, n.1, p.1-5, 2011.
- SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. **Plant Physiology**. 4 ed. Califórnia: Wadsworth, 682p., 1992.
- SANDBERG, G. et al. Regulation of indole-3-acetic acid turnover in plants. **Plant and Plant cells Canterbury Meeting**, v.20, 1993.
- SANSONE, G. et al. Control of *Botrytis cinerea* strains resistant to iprodione in apple with rhodotorulic acid and yeasts. **Postharvest Biology Technology**, v.35, p.245–251, 2005.
- 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.
- SHARMA, V. K. et al. Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. **Adv. Colloid Interface Sci.**, v.145, p.83–96, 2009.
- SMITH, D.R.; THORPE, T.A. Root initiation in cuttings of *Pinus radiata* seedlings. II Growth regulator interactions. **J. Exp. Bot.**, p.193-202., 1975.
- SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiol Rev**, v.31, p.425-448, 2007.

- SRIDEVI, M.; MALLAIAH, K. V. Production of indole-3-acetic acid by *Rhizobium* isolates from *Sesbania* species. **African Journal of Microbiology Research**, v.1, p.125-128, 2007.
- STARMER, W.T.; LACHANCE, M.A. **Yeast ecology**. In: (KURTZMAN, C. P.; FELL, J.; BOEKHOUT, T.) *The Yeasts: A Taxonomic Study*, 5th ed. Elsevier, 2011.
- STRZELCZYK, E.; POKOJSKA, A.; KAMPERT, M. The effect of pH on production of plant growth regulators by mycorrhizal fungi. **Symbiosis**, v.14, p.201-215, 1992.
- SUN, P. F. et al. Indole-3-acetic acid-producing yeasts in the phyllosphere of the carnivorous plant *Drosera indica* L. **PLoS One**, 9(12), p.114-196, 2014.
- SZKOP, M.; BIELAWSKI, W. A simple method for simultaneous RP-HPLC determination of indolic compounds related to bacterial biosynthesis of Indole-3-Acetic acid. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.103, p.683-691, 2013.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 719p., 2004.
- TEALE, W.D.; PAPONOV, I.A.; PALME, K. Auxin in action: Signalling, transport and the control of plant growth and development. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v.7, p.847–859, 2006.
- TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. *Microbiology*. 6 ed. Califórnia: Art Méd, 2002.
- TOYOMASU, T. et al. 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.
- TSAVKELOVA, E. A. et al. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. **Microbiological Research**, v.162, p.69-76, 2007.
- TSAVKELOVA, E.A. et al. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. **Appl. Biochem. Micro.**, v.42, p.117–126, 2006.
- TROTSSENKO, Y. A.; IVANOVA, E. G.; DORONINA, N. V. Aerobic methylotrophic bacteria as phytosymbionts. **Mikrobiologiya**, v.70, p.725–736 (in Russian), 2001.
- VAN DER WALT J. P. *Saccharomyces* Meyer emend. Reess. **The Yeasts, A Taxonomic Study**, 2nd ed., p.555–718. North-Holland, the Netherlands, 1970.

- VASSILEVA, M. et al. Rock phosphate solubilization by free and encapsulated cells of *Yarrowia lipolytica*. **Process Biochemistry**, v.35, p.693–697, 2000.
- VAUGHAN-MARTINI, A.; POLLACCI, P.; BARCACCIA, S. A reconsideration of species designations of some strains of the industrial yeasts collection DBVPG assigned to the genus *Torulaspora*. **Ann Microbiol Enzymol**, v.49, p.67–77, 1999.
- VAZ, A. B. M. et al. The diversity, extracellular enzymatic activities and photoprotective compounds of yeasts isolated in Antarctica. **Braz J Microbiol**, v.42, p.937–947, 2011.
- VIEIRA, E. N. R. *Influência do tipo de mosto e do gênero de levedura na formação de aminas bioativas e carbamato de etila em destilados alcoólicos*. 2011. 167p. Tese de Doutorado - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.
- WALT, J. P. Vander.; YARROW, D. Methods for isolation maintenance, classification and identification of yeast. In: KREGGER-VAN RIJ, N. S. W. (Ed). **The yeasts: a taxonomy study**. Amsterdam: Elsevier Science, p.45-104, 1984.
- WOODWARD, A. W.; BARTE, B. Auxin: regulation, action, and interaction. **Ann Bot**, v.95, p.707–735, 2005.
- 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.
- YARROW, D. The Yeasts, A Taxonomic Study, 3rd ed, p.434-439. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1984.
- YU, P. H.; CHEN, C. C.; WU, L. Production of indoleacetic acid by *Nectria pterospermi* saw. **Bot Bul Acad Sinica**, v.11, p.98-104, 1970.
- YU, T. et al. 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.
- ZÚÑIGA, A. et al. 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.

ANEXO I

Resultado do *Blast (Basic Local Alignment Search Tool)* do isolado de levedura selecionado para os testes de otimização

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Torulaspora globosa culture-collection CBS:5216 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1086	1086	100%	0.0	100%	KY109864.1
Torulaspora sp. APSS 805 genomic DNA containing 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28	1086	1086	100%	0.0	100%	HE574639.1
Torulaspora indica culture-collection CBS:12408 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1081	1081	100%	0.0	99%	KY109871.1
Torulaspora globosa culture-collection CBS:2952 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1081	1081	100%	0.0	99%	KY109867.1
Torulaspora sp. AP 18 genomic DNA containing 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rR	1081	1081	100%	0.0	99%	HE575669.1
Torulaspora sp. PBA 22 genomic DNA containing 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S r	1081	1081	100%	0.0	99%	HE575668.1
Torulaspora globosa culture-collection CBS:6637 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1075	1075	100%	0.0	99%	KY109869.1
Torulaspora globosa culture-collection CBS:6638 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1075	1075	100%	0.0	99%	KY109862.1
Torulaspora globosa culture-collection CBS:6636 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1074	1074	99%	0.0	99%	KY109861.1
Torulaspora globosa culture-collection CBS:5503 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1070	1070	100%	0.0	99%	KY109870.1
Torulaspora globosa culture-collection CBS:5500 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1070	1070	100%	0.0	99%	KY109866.1
Torulaspora globosa culture-collection CBS:764 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1070	1070	100%	0.0	99%	KY109865.1
Torulaspora globosa strain CBS 2947 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	1070	1070	100%	0.0	99%	KF300888.1
Torulaspora globosa gene for 26S rRNA, partial sequence, strain: LY10	1059	1059	97%	0.0	100%	AB499015.1
Torulaspora sp. DMKU-SV01 gene for 26S rRNA, partial sequence, specimen voucher DMKU-SV01	1053	1053	97%	0.0	99%	AB836684.1
Torulaspora globosa strain CBS 764 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	1050	1050	98%	0.0	99%	KF300889.1
Torulaspora pretoriensis culture-collection CBS:11124 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequer	1048	1048	100%	0.0	99%	KY109883.1
Torulaspora pretoriensis culture-collection CBS:11121 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequer	1048	1048	100%	0.0	99%	KY109882.1
Torulaspora pretoriensis culture-collection CBS:11123 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequer	1042	1042	100%	0.0	99%	KY109880.1
Torulaspora pretoriensis strain CBS 2187 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	1042	1042	100%	0.0	99%	KF300887.1
Torulaspora globosa 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	1042	1042	97%	0.0	99%	U72166.1

Torulaspora globosa culture-collection CBS:5216 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: [KY109864.1](#) Length: 914 Number of Matches: 1

Range 1: 15 to 602 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1086 bits(588)	0.0	588/588(100%)	0/588(0%)	Plus/Plus
Query 1	GGAGGAAAAGAAAACCAACCGGGATTGCCTCA	GTAAACGGCGAGTGAAGCGCAAAAAGCTCA	60	
Sbjct 15	GGAGGAAAAGAAAACCAACCGGGATTGCCTCA	GTAAACGGCGAGTGAAGCGCAAAAAGCTCA	74	
Query 61	AATTTGAAATCTGGTACCTTCGGTGC	CCGAGTTGTAATTTGTAGAAGGTAAC	120	
Sbjct 75	AATTTGAAATCTGGTACCTTCGGTGC	CCGAGTTGTAATTTGTAGAAGGTAAC	134	
Query 121	TGGTCCTTGCTATGTTCTTGGAAACAG	GACGTCATAGAGGGTGAAGATCCCGT	180	
Sbjct 135	TGGTCCTTGCTATGTTCTTGGAAACAG	GACGTCATAGAGGGTGAAGATCCCGT	194	
Query 181	AGGATCCCAAGTTCTATGTAAGTGCTT	TCGAAGAGTCGAGTTGTTGGGAATGC	240	
Sbjct 195	AGGATCCCAAGTTCTATGTAAGTGCTT	TCGAAGAGTCGAGTTGTTGGGAATGC	254	
Query 241	AAGTGGGTGGTAAATCCATCTAAAGCT	AAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAA	300	
Sbjct 255	AAGTGGGTGGTAAATCCATCTAAAGCT	AAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAA	314	
Query 301	ACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTT	TGAAAAGAGAGTGAAAAGTACGTGAA	360	
Sbjct 315	ACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTT	TGAAAAGAGAGTGAAAAGTACGTGAA	374	
Query 361	GAAAGGGAAAGGGCATTGATCAGACAT	GGTGTTTGGCCCTCTGCTCCTCGTGG	420	
Sbjct 375	GAAAGGGAAAGGGCATTGATCAGACAT	GGTGTTTGGCCCTCTGCTCCTCGTGG	434	
Query 421	GGAACTTCGCACCTCAC	TGGGCCAGCATAGTTTGGCGGTAGG	480	
Sbjct 435	GGAACTTCGCACCTCAC	TGGGCCAGCATAGTTTGGCGGTAGG	494	
Query 481	GTAGCTTGCCTCGCAAGTGTATAGCCT	GTTGAAATACTGCCAGCCGGACTGAG	540	
Sbjct 495	GTAGCTTGCCTCGCAAGTGTATAGCCT	GTTGAAATACTGCCAGCCGGACTGAG	554	
Query 541	GCGACTTTTAGTCAAGGATGCTGGCATA	AATGTTATATGCCGCCGCTC	588	
Sbjct 555	GCGACTTTTAGTCAAGGATGCTGGCATA	AATGTTATATGCCGCCGCTC	602	

ANEXO II

Tabela de Estimativa dos Efeitos das variáveis avaliadas durante o tempo (24, 48, 72 e 96 horas)

Tabela de Estimativa dos Efeitos das variáveis avaliadas após 24 horas de incubação.

24h	Erro	T	p-valor	Lim. Conf. -95%	Lim. Conf. +95%
Intercept	2070,131	-1,42825	0,176801	-7428,92	1515,574
pH	6,575	2,27457	0,040524	0,75	29,16
Temperatura	23,337	-1,0065	0,332541	-73,91	26,928
Agitação	23,337	1,49661	0,158374	-15,49	85,344
Carbono	23,337	-0,99133	0,339616	-73,55	27,282
Nitrogênio	23,337	1,73797	0,105829	-9,86	90,977

Tabela de Estimativa dos Efeitos das variáveis avaliadas após 48 horas de incubação.

48h	Erro	T	p-valor	Lim. Conf. -95%	Lim. Conf. +95%
Intercept	1460,804	1,50937	0,155122	-950,987	5360,761
pH	4,640	3,26983	0,006091	5,148	25,194
Temperatura	16,468	-0,77359	0,453009	-48,317	22,838
Agitação	16,468	-5,04357	0,000225	-118,636	-47,481
Carbono	16,468	0,67409	0,512062	-24,476	46,678
Nitrogênio	16,468	3,82364	0,002110	27,391	98,546

Tabela de Estimativa dos Efeitos das variáveis avaliadas após 72 horas de incubação.

72h	Erro	T	p-valor	Lim. Conf. -95%	Lim. Conf. +95%
Intercept	1764,282	1,01440	0,328899	-2021,80	5601,193
pH	5,604	2,30920	0,038004	0,83	25,045
Temperatura	19,889	-0,32042	0,753740	-49,34	36,595
Agitação	19,889	-2,35469	0,034920	-89,80	-3,865
Carbono	19,889	-0,33488	0,743055	-49,63	36,308
Nitrogênio	19,889	2,11784	0,054032	-0,85	85,091

Tabela de Estimativa dos Efeitos das variáveis avaliadas após 96 horas de incubação.

96h	Erro	T	p-valor	Lim. Conf. -95%	Lim. Conf. +95%
Intercept	1366,022	0,98540	0,342414	-1605,03	4297,189
pH	4,339	3,23805	0,006476	4,68	23,422
Temperatura	15,400	-0,57762	0,573387	-42,16	24,374
Agitação	15,400	-1,85452	0,086483	-61,83	4,710
Carbono	15,400	0,50073	0,624934	-25,56	40,980
Nitrogênio	15,400	1,05240	0,311786	-17,06	49,475