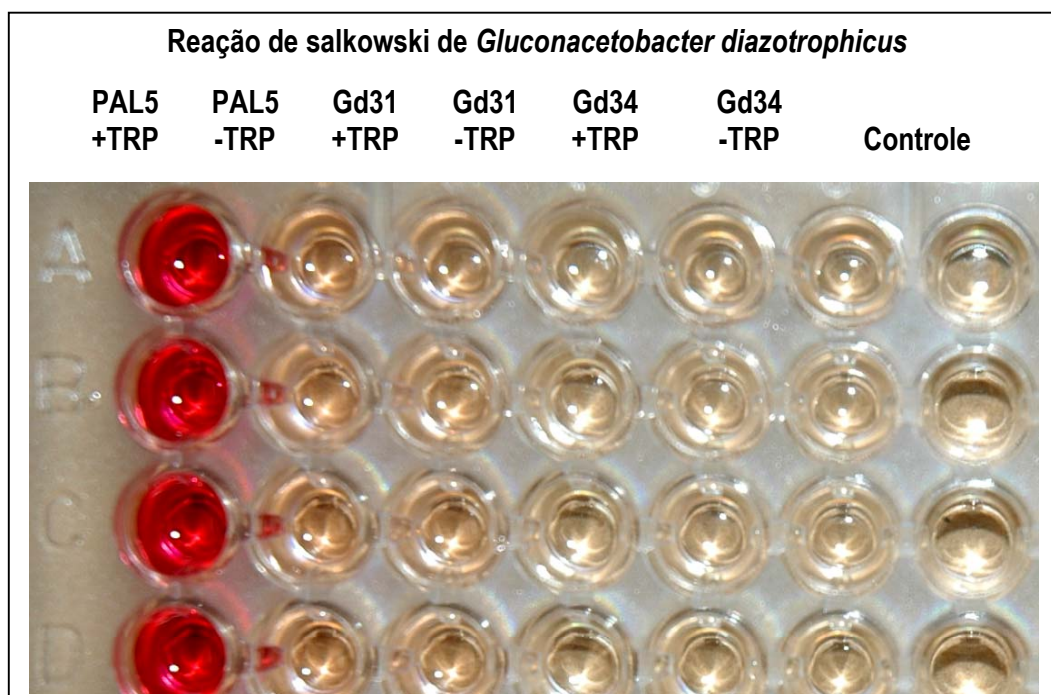


## Obtenção e Seleção de Mutantes Tn5 de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Pal 5) com Alterações na Produção de Auxinas







Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

ISSN 1676-6709  
Dezembro/2007

# **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 27**

**Obtenção e Seleção de Mutantes Tn5 de  
*Gluconacetobacter diazotrophicus* (Pal 5)  
com Alterações na Produção de Auxinas**

Elisete Pains Rodrigues  
André Luiz Martinez de Oliveira  
Marcia Soares Vidal  
Jean Luiz Simões-Araújo  
José Ivo Baldani

*Seropédica – RJ*  
2007

Exemplares desta publicação podem ser adquiridas na:

**Embrapa Agrobiologia**

BR 465 – km 7

Caixa Postal 74505

23851-970 – Seropédica/RJ, Brasil

Telefone: (0xx21) 2682-1500

Fax: (0xx21) 2682-1230

Home page: [www.cnpab.embrapa.br](http://www.cnpab.embrapa.br)

e-mail: [sac@cnpab.embrapa.br](mailto:sac@cnpab.embrapa.br)

Comitê Local de Publicações: Eduardo F. C. Campello (Presidente)  
José Guilherme Marinho Guerra  
Maria Cristina Prata Neves  
Verônica Massena Reis  
Robert Michael Boddey  
Maria Elizabeth Fernandes Correia  
Dorimar dos Santos Felix (Bibliotecária)

Expediente:

Revisores e/ou ad hoc: Norma Gouvea Rumjanek e Gustavo Ribeiro Xavier

Normalização Bibliográfica: Dorimar dos Santos Felix

Editoração eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia

1ª impressão (2007): 50 exemplares

R696l Rodrigues, Elisete Pains

Obtenção e seleção de mutantes Tn5 de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Pal 5) com alterações na produção de auxinas / André Luiz Martinez de Oliveira, Marcia Soares Vidal, Jean Luiz Simões-Araújo, José Ivo Baldani. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007. 20 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Agrobiologia, ISSN 1516-2311 ; 27).

Auxina. 2. Estimulante de crescimento vegetal. I. Oliveira, A. L. M. de, colab. II. Vidal, M. S., colab. III. Simões-Araújo, J. L., colab. IV. Baldani, J. I., colab. V. Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (Seropédica, RJ). VI. Título. VII. Série.

CDD 547.734.2

## **Autores**

### **Elisete Pains Rodrigues**

Doutoranda em Biotecnologia Vegetal, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro. E-mail: bioliza@yahoo.com.br

### **André Luiz Martinez de Oliveira**

Professor da Universidade Estadual de Londrina. Departamento de Bioquímica e Biotecnologia. PhD em Ciências do Solo. E-mail: almoliva@uel.br

### **Marcia Soares Vidal**

Pesquisadora da Embrapa Agrobiologia, Bióloga, DSc. em Genética. Rodovia BR 465, km 7. Seropédica - RJ - Brasil - CEP: 23890-000. E-mail: marcia@cnpab.embrapa.br

### **Jean Luiz Simões-Araújo**

Pesquisador da Embrapa Agrobiologia, Engenheiro Agrônomo, PhD em Genética. Rodovia BR 465, km 7. Seropédica - RJ - Brasil - CEP: 23890-000. E-mail: jean@cnpab.embrapa.br

### **José Ivo Baldani**

Pesquisador da Embrapa Agrobiologia, Engenheiro Agrônomo, PhD em Ciência do Solo. Rodovia BR 465, km 7. Seropédica - RJ - Brasil - CEP: 23890-000. E-mail: ibaldani@cnpab.embrapa.br



# SUMÁRIO

Resumo.....	7
Abstract.....	7
Introdução.....	8
Material e Métodos.....	9
1 – Meios de cultura e reagentes utilizados:.....	9
2 – Construção da curva de calibração de AIA:.....	10
3 – Curva de crescimento e produção de AIA por Pal 5:.....	10
4 – Geração dos mutantes aleatórios de <i>G. diazotrophicus</i> (Pal 5): ...	11
5 – Seleção dos mutantes:.....	12
Resultados e Discussão.....	13
Agradecimentos.....	17
Referências Bibliográficas.....	17





# Obtenção e Seleção de Mutantes Tn5 de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Pal 5) com Alterações na Produção de Auxinas

---

*Elisete Pains Rodrigues  
André Luiz Martinez de Oliveira  
Marcia Soares Vidal  
Jean Luiz Simões-Araújo  
José Ivo Baldani*

## Resumo

---

Fitohormônios têm um papel importante como reguladores do crescimento e do desenvolvimento das plantas. Muitos microrganismos associados a plantas são capazes de sintetizar fitohormônios, principalmente auxinas. Aqui nós descrevemos a geração de mutantes Tn5 de *Gluconacetobacter diazotrophicus* e um método simples para detectar eficientemente a produção de auxinas em cultura líquida.

Termos para indexação: Transposon Tn5, compostos indólicos, detecção de AIA

## Obtation and selection of *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Pal5) Tn5 mutants with altered pattern in auxin production

---

## Abstract

---

Phytohormones play an important role as regulators of plant growth and development. Many plant-associated microorganisms are capable of synthesizing phytohormones. Here we described the generation of *Gluconacetobacter diazotrophicus* Tn5 mutants and a simple method to efficiently detect auxin production in liquid culture.

Index terms: Transposon Tn5, indolic compounds, IAA detection

## Introdução

---

*Gluconacetobacter diazotrophicus* é uma bactéria diazotrófica endofítica isolada inicialmente de raízes e colmos de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) (CAVALCANTE & DÖBEREINER, 1988), e posteriormente encontrada associada a diversos hospedeiros como a batata-doce (*Ipomoea batatas*), capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) (DÖBEREINER et al., 1993), café (*Coffea arabica*) (JIMENEZ-SALGADO et al., 1997) e abacaxi (*Ananas comosus*) (TAPIA-HERNANDEZ et al., 2000).

A promoção do crescimento de plantas de cana-de-açúcar por esta bactéria tem sido relacionada à sua capacidade de colonizar e fixar nitrogênio atmosférico no interior dos tecidos resultando em aumentos no nitrogênio acumulado nos tecidos da cana. Além disso, estudos de inoculação em cana têm evidenciado efeitos positivos na sobrevivência das plântulas, no comprimento e no volume radicular (CAVALCANTE & DÖBEREINER, 1988; REIS et al., 1994; MUTHUKUMARASAMY et al., 1999; 2002; OLIVEIRA et al., 2002; MUÑOZ-ROJAS & CABALLERO-MELLADO, 2003).

Mais recentemente, considera-se que a produção de fitormônios, tais como ácido-3-indol acético (AIA), giberelinas e citocininas (FUENTES-RAMÍREZ et al., 1993; JIMÉNEZ-SALGADO et al., 1994; BASTIAN et al., 1998), também podem estar relacionados à promoção do crescimento vegetal (SEVILLA et al., 1998; 2001). Devido a importância do AIA no desenvolvimento vegetal e seu possível papel na interação entre a planta e a bactéria e imprescindível conhecer como este composto é sintetizado por *G. diazotrophicus* e qual o seu papel na promoção do crescimento e na interação com a cana-de-açúcar.

O sequenciamento do genoma de *G. diazotrophicus* (estirpe selvagem Pal 5) foi iniciado em 2002 pelo consórcio RIOGENE (FAPERJ/CNPq) e, recentemente concluído. A utilização desses conhecimentos aliados aos estudos de genômica funcional abrirá novas oportunidades no campo da biotecnologia através da identificação de rotas metabólicas e compostos envolvidos na sinalização molecular e na promoção do crescimento da cana-de-açúcar. Neste sentido, buscou-se estudar a função de genes envolvidos na biossíntese de AIA através da caracterização de mutantes aleatórios com alteração na produção de AIA. A obtenção e seleção de mutantes é uma etapa extremamente

trabalhosa, pois é necessário avaliar uma biblioteca de um grande número de clones em busca de mutantes promissores. Diante disso, torna-se necessário utilizar uma metodologia que permita a avaliação de grande quantidade de clones com eficiência, rapidez e baixo custo. Para esta finalidade, os métodos colorimétricos são muito úteis, uma vez que se pode estimar rapidamente a quantidade de AIA produzida. Dentre estes, o reagente de Salkowski vem sendo cada vez mais utilizado pela sua especificidade a compostos indólicos, pelo baixo custo e pela sua praticidade (GORDON & WEBER, 1951; SARWAR & KREMER, 1995; GLICKMANN & DESSAUX, 1995). Este trabalho descreve a utilização do reagente de Salkowski na seleção em larga escala de mutantes aleatórios com alteração na produção de AIA.

## **Material e Métodos**

---

### **1 – Meios de cultura e reagentes utilizados:**

- **Meio LGI-P modificado** (CAVALCANTE & DÖBEREINER, 1988): 100 g.L<sup>-1</sup> de açúcar cristal; 0,2 g.L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,6 g.L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,2 g.L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,02 g.L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 0,002 g.L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O; 0,01 g.L<sup>-1</sup> de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O; 1,32 g.L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 5,5.
- **Meio Dygs** (RODRIGUES NETO et al., 1986): 6 g.L<sup>-1</sup> de glicose; 1,5 g.L<sup>-1</sup> de peptona bacteriológica; 2,0 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura; 0,5 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,5 g.L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 1,5 g.L<sup>-1</sup> de ácido glutâmico; pH 6,0.
- **Meio C2**: 15 g.L<sup>-1</sup> de glicose; 10 g.L<sup>-1</sup> de peptona bacteriológica; 5 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura; 5 g.L<sup>-1</sup> de NaCl, pH 6,0.

Para os meios sólidos foram acrescentados 15 g.L<sup>-1</sup> de ágar bacteriológico.

- **Solução de Triptofano**: Foi preparado uma solução estoque (10,1 mg/mL) de triptofano em água destilada, adicionando aos poucos algumas gotas de KOH necessário para dissolução do triptofano. Após filtração em millipore 0,2 µm a solução foi armazenada na geladeira (4°C) em frasco escuro. Para uma concentração final de 100 µg/mL de triptofano adicionou-se 1 mL da solução estoque (10,1 mg/mL) em 100 mL de meio de cultura esterilizado.

- **Solução de AIA sintético:** Foi preparado uma solução estoque 10 mM (1,75 mg/mL) de AIA em água destilada, adicionando aos poucos algumas gotas de KOH. Esta solução foi diluída em água destilada, em concentrações crescentes de 0 a 1000  $\mu$ M, para construção da curva de calibração de AIA.
- **Reagente de Salkowski (GORDON & WEBER, 1951):** Um alíquota de 1 mL de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,5 M (1,35 g/10 mL) foi adicionado a 50 mL de  $\text{HClO}_4$  (35%).

## 2 – Construção da curva de calibração de AIA:

Concentrações crescentes de 0 a 1000  $\mu$ M/mL de AIA (Vetec) foram utilizadas na construção da curva de calibração empregando o método descrito por SARWAR & KREMER (1995). Alíquotas de 150  $\mu$ L de cada diluição foram transferidas para microplacas de poliestireno de 96 poços com capacidade de 300  $\mu$ L por poço. Em seguida, foram adicionados 100  $\mu$ L do reagente de Salkowski. Após 30 minutos de reação no escuro a temperatura ambiente, a intensidade da coloração foi avaliada em comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 540nm utilizando o espectrofotômetro Labsystems iEMS Reader MF. Os dados de absorbância foram processados pelo programa Ascent Software for iEMS Reader MF e, posteriormente, plotados em um gráfico de dispersão (X,Y) utilizando o MICROSOFT OFFICE EXCEL (2003).

## 3 – Curva de crescimento e produção de AIA por Pal 5:

A estirpe selvagem Pal 5 foi cultivada em microplacas em meio LGI-P na presença e na ausência de triptofano em dois experimentos independentes. No experimento 1, colônias de Pal 5 em meio Dygs foram inoculadas com palito de dente estéreis em microplacas contendo 1 mL de meio líquido LGI-P modificado [sem azul de bromotimol e contendo 10 mM de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como fonte de Nitrogênio, com e sem L-triptofano (100  $\mu$ g/mL)]. As microplacas foram incubadas a 30°C sob agitação (200 rpm) por até quatro dias, com 3 repetições. No experimento 2, dois tipos de inóculo foram avaliados na presença de L-triptofano: células de colônia e de cultura líquida. O inóculo de colônia foi proveniente de meio sólido LGI-P e o inóculo de cultura líquida de uma suspensão de células lavadas e ajustadas a  $\text{DO}_{620 \text{ nm}}$  de 0,4 (10  $\mu$ L/poço). O crescimento foi avaliado por até sete dias (168 horas), com sete repetições. O crescimento da bactéria foi medido

pela Densidade Ótica ( $DO_{620\text{ nm}}$ ) da cultura (200  $\mu\text{L}$ ) em microplacas. Em seguida, a cultura foi centrifugada (10.000 rpm, 5 min) e o sobrenadante (150 mL) utilizado nas reações colorimétricas conforme descrito acima. A concentração de AIA foi determinada utilizando a equação da curva de calibração de AIA.

#### **4 – Geração dos mutantes aleatórios de *G. diazotrophicus* (Pal 5):**

A estirpe selvagem Pal 5 (ATCC 49037) (GILLIS et al., 1989; YAMADA et al., 1998), isolada originalmente de cana-de-açúcar por CAVALCANTE & DÖBEREINER (1988), foi utilizada para obtenção dos mutantes, pela eletroporação de células eletrocompetentes de Pal 5 com o kit Transposon EZ-Tn5<sup>TM</sup> <KAN-2> Tnp da Epicentre. Este sistema é um complexo estável formado entre a Transposase e o Transposon, o qual é ativado na presença de  $\text{Mg}^{+2}$ . Pela inserção do TN5 randomicamente no genoma de Pal 5, obteve-se a biblioteca de mutantes aleatórios a qual foi utilizada para a seleção de clones alterados na sua capacidade de produção de AIA. As células eletrocompetentes de Pal 5 foram obtidas conforme metodologia descrita por ROUWS et al. (2006). A estirpe Pal 5 foi cultivada sob agitação a 30°C em 200 ml de meio C-2 até a densidade óptica ( $DO_{620\text{nm}}$ ) de 0,6-0,7. Após centrifugação, o sedimento foi lavado com glicerol 50% e, em seguida, com glicerol 10% para remover exopolissacarídeos e impurezas. As células lavadas foram ressuspensas em 4 mL de glicerol (10%). Alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  foram distribuídas em microtubos e armazenadas a -70°C. A eletroporação foi realizada conforme Rouws et al. (2006). Células eletrocompetentes (100  $\mu\text{L}$ ) descongeladas no gelo foram misturadas com 1  $\mu\text{L}$  de transposon (20 ng) e transferido para eletrocubetas de 2mm (BIO RAD) previamente geladas. Na eletroporação foi empregado o aparelho “Electro Cell Manipulator 600” (BTX Inc. EUA) para aplicação do pulso elétrico (2,5 kv, 186  $\Omega$ , constante de tempo  $\sim 0,8$  msec, high voltage). Imediatamente após o pulso, adicionou-se 1 mL de meio C2 à eletrocubeta e após homogeneização, transferiu-se a suspensão para um tubo Falcon<sup>TM</sup> contendo 1 mL de meio C2. Após 2h a 30°C/150 rpm, a suspensão foi centrifugada a 5000 rpm/5 min e o pellet ressuspenso em 500  $\mu\text{L}$  de meio C2. Alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  de suspensão foram semeadas em meio Dygs contendo 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  do antibiótico canamicina. As placas foram incubadas a 30°C por três dias. Os mutantes obtidos foram cuidadosamente repicados com

palitos de dente estéreis para placas Master com meio Dygs contendo 200 µg/mL de canamicina.

## **5 – Seleção dos mutantes:**

A seleção dos mutantes foi realizada pela quantificação de AIA produzida em meio de cultura. Para tal, foi empregado o método colorimétrico descrito por SARWAR & KREMER (1995), o qual utiliza o reagente de Salkowski para análises em microplacas. Após crescimento a 30°C por três dias, colônias frescas dos mutantes foram inoculadas com palitos em microplacas de polipropileno com 96 poços com capacidade de 2 mL cada contendo 1 mL de meio líquido LGI-P acrescido de 100 µg/mL de L-triptofano (Vetec) como precursor da biossíntese de ácido-indol-acético (AIA) e 100 µg/mL de Canamicina. A primeira coluna de cada microplaca foi reservada para os controles negativo (não inoculado) e positivo (estirpe selvagem Pal5). Após cultivo a 30°C sob agitação de 200 rpm por 48 horas no escuro, 200 µL de cada cultura foram transferidos para microplacas de poliestireno com 96 poços com capacidade de 300 µL para leitura da Densidade Ótica ( $DO_{620\text{nm}}$ ). As culturas restantes foram centrifugadas a 4000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante utilizado nas reações colorimétricas conforme descrito acima. A concentração de AIA foi determinada utilizando a equação da curva de calibração de AIA.

Os mutantes promissores foram selecionados calculando-se a porcentagem de variação na produção de auxina em relação a estirpe selvagem Pal 5, dentro da mesma faixa de Densidade Ótica ( $DO_{620\text{nm}}$ ). Os mutantes que apresentaram variação de  $\pm 50\%$  foram selecionados para reavaliação da produção de auxinas. Estes mutantes foram inoculados em novas placas de Dygs e re-avaliados nas mesmas condições descritas acima, com três repetições. Após esta confirmação, os mutantes com significativa alteração na produção de AIA foram inoculados em placas de Dygs e após 3 dias, as colônias foram inoculadas com palitos em tubos com 5 mL de meio líquido Dygs (com canamicina) e mantidos por 16 horas sob agitação a 150 rpm e 30°C. Vinte microlitros desta cultura foram empregados como pré-inóculo em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio líquido LGI-P modificado, com 100 µg/mL de L-triptofano. Os frascos foram mantidos a 30°C sob agitação de 150 rpm e as análises de produção de AIA realizadas com 48, 72 e 96 horas de crescimento, conforme descrito acima.

## Resultados e Discussão

O reagente de Salkowski tem sido utilizado para a quantificação e detecção de auxinas devido a sua especificidade para compostos indólicos como AIA (GORDON & WEBER, 1951; SARWAR & KREMER, 1995; GLICKMANN & DESSAUX, 1995). Tem sido observado que as estimativas obtidas com este reagente têm elevada correlação com dados de HPLC que é uma técnica mais refinada utilizada na identificação e quantificação de auxinas entre outras substâncias (SARWAR & KREMER, 1995). Aliado a isto, o preparo deste reagente é simples e de baixo custo. Assim optou-se por utilizar este reagente na detecção de AIA. Por ser uma medida colorimétrica, para estimar a quantidade de auxinas produzida pela bactéria faz-se necessário construir uma curva de calibração com AIA sintético. Comprimentos de onda  $\cong 530$  nm são relatados na literatura para detecção de auxinas utilizando o reagente de Salkowski (GLICKMANN & DESSAUX, 1995; SARWAR & KREMER, 1995). Neste trabalho, a avaliação em diferentes comprimentos de onda, demonstrou maior absorvância à  $\lambda_{540\text{nm}}$  que à  $\lambda_{492\text{nm}}$ . Pouca ou nenhuma detecção de auxinas foi observada em  $\lambda$  maiores que 620nm e menores que 492 nm (Figura 1). O  $\lambda_{540\text{nm}}$  foi então escolhido para a construção da curva de calibração e para a realização das análises com os mutantes. A curva de calibração demonstrou que o reagente de Salkowski permite detectar auxinas em concentrações de 25  $\mu\text{M/mL}$  (4,38  $\mu\text{g/mL}$ ) a 1000  $\mu\text{M/mL}$  (175,19  $\mu\text{g/mL}$ ), com grande sensibilidade do reagente em concentrações acima de 50  $\mu\text{M/mL}$  (8,76  $\mu\text{g/mL}$ ). A equação da curva de regressão linear ( $R^2$  de 0,9902) foi utilizado na quantificação de auxinas produzida pelos mutantes.

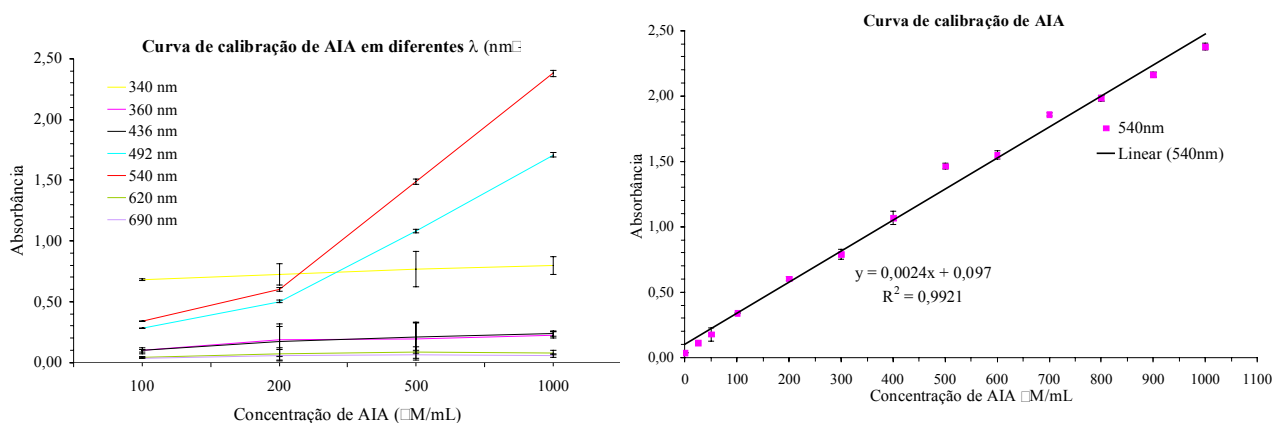


Figura 1: Valores de absorvância em função da concentração de AIA. Cada ponto representa a média de 4 repetições e o intervalo de confiança a  $p$  0,05%.

A produção de auxinas pela estirpe Pal 5 ocorre durante todo o crescimento da bactéria, principalmente na presença de triptofano, já que a adição deste ao meio aumentou significativamente a produção. Este é um forte indicativo que o triptofano é o precursor essencial para a produção de auxinas por *G. diazotrophicus*, como observado para outras bactérias (TIEN et al., 1979; PRINSEN et al., 1993; ZIMMER et al., 1988; RADWAN et al., 2002) (Figura 2 – Exp. 1). No início da fase logarítmica de crescimento ( $DO_{620nm}$  de 0,2-0,4) onde a atividade metabólica da bactéria é máxima observou-se grande produção de auxinas, em ambos experimentos. Entretanto, a máxima produção pôde ser observada após 24, 48 ou 72 h de incubação (Figura 2), devido a diferenças no crescimento da bactéria. No experimento 1, por exemplo, houve uma fase *lag* de 24 h. A produção de auxinas diminuiu após a máxima produção, sendo entretanto ainda detectado após 168 h de incubação em concentrações mais baixas (100-200  $\mu\text{M}/\text{mL}$ ). Portanto, a quantificação de auxinas em Pal 5 deve ser feita com curtos períodos de incubação quando esta é cultivada em microplacas. Não observou-se grandes diferenças entre os tipos de inóculo testados (líquido e colônia). Algumas alterações na cultura após longos períodos de incubação foram observados nas condições de microplacas. Após 72 horas de incubação, o meio tornou-se mais escuro com a presença de “grumos” marrons dispersos no meio. As células depositaram-se facilmente no fundo do poço, o que foi mais evidente após 48 horas de incubação. Estas alterações podem ser devido a baixa aeração do meio nestas condições.

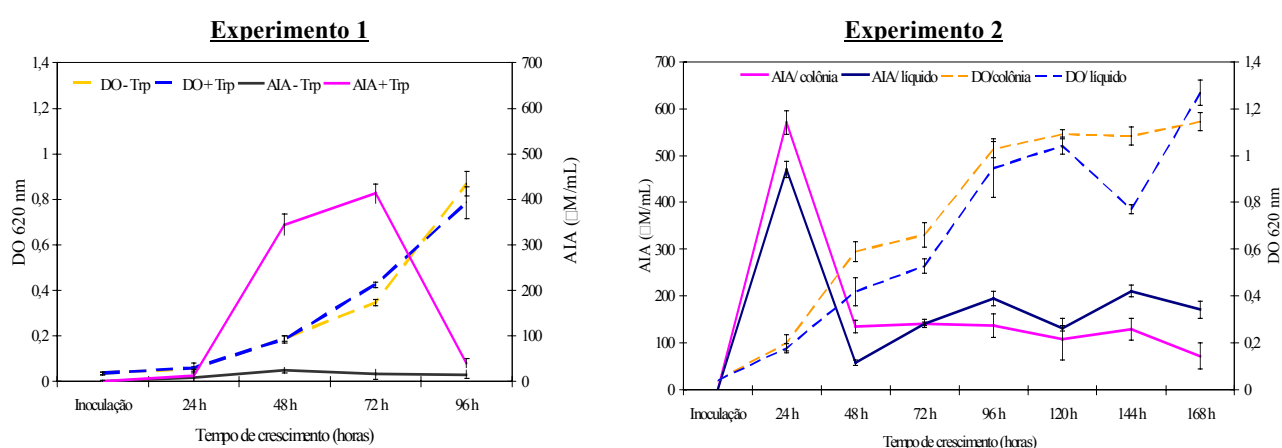


Figura 2: Curva de crescimento e produção de AIA da estirpe selvagem Pal 5. Cada ponto representa a média de 3 (Exp. 1) ou 7 (Exp. 2) repetições e o intervalo de confiança a  $p$  0,05%.



A utilização do kit EZ-TN5 da Epicentre permitiu a construção de uma biblioteca de mutantes aleatórios de forma rápida e fácil, onde aproximadamente 1.100 colônias mutantes foram obtidas por eletroporação com 1  $\mu$ L de transposon (20 ng de DNA), equivalente a uma frequência de  $5,5 \times 10^4$  transformantes/ $\mu$ g de DNA.

As observações no crescimento e na produção de auxinas obtidas nos dois experimentos com a estirpe Pal5 direcionaram as avaliações posteriores e tornaram mais fáceis a seleção de mutantes promissores.

Foram avaliados 2.000 mutantes quanto à produção de AIA utilizando a metodologia de seleção em microplacas. Baseados, nos resultados de cultivo da estirpe selvagem Pal 5 nestas condições, foram estabelecidas inicialmente que as análises seriam feitas com 24 horas de crescimento; entretanto, com 24 horas foi observado que a maioria dos mutantes não havia crescido. Optou-se, assim, por padronizar as análises após 48 horas de crescimento. Devido a estas variações no crescimento, os mutantes foram agrupados por faixas de D.O. e avaliados por grupo. Em cada grupo, aqueles que apresentaram variação de +50% ou -50% na produção de AIA foram selecionados. Assim, 86 mutantes foram selecionados para confirmação, desta vez sendo cultivados em tubos de ensaio, com três repetições. Desta forma, foram obtidos cinco mutantes com alteração na produção de AIA (Tabela 1). A produção de auxinas foi reduzida a zero nos mutantes 25, 31 e 34, com variação de -100% em relação à estirpe selvagem Pal 5, após 48 e 72 horas de crescimento. Estes mutantes apresentaram crescimento normal semelhante à estirpe selvagem, em meio LGI-P suplementado com triptofano (Figura 3 e Tabela 1) indicando que a inserção do Tn5 ocorreu em genes de biossíntese de AIA. O mutante 24 também cresceu normalmente, entretanto, apresentou uma curva de produção de AIA significativamente diferente da selvagem. A produção de AIA foi reduzida em até 60%, mas se manteve por mais tempo de crescimento, contrastando com a curva de produção de AIA por Pal 5, a qual após 72 h de crescimento reduziu drasticamente. É possível que neste mutante o Tn5 tenha se inserido em genes com função na regulação da biossíntese de AIA, ou no sistema de transporte. A produção de AIA no mutante 47 também foi reduzida, mas este foi o único que apresentou curva de crescimento diferente da estirpe selvagem Pal 5 (Tabela 1, Figura 3), indicando que a mutação possa ter ocorrido em outros genes não relacionados à

biossíntese de AIA. Novos estudos com estes mutantes são necessários para identificar o gene mutante e sua relação com a biossíntese de AIA em *G. diazotrophicus*. A caracterização por HPLC permitirá identificar nestes mutantes quais substâncias deixaram de ser produzidas, complementando os estudos de caracterização dos mutantes.

No presente estudo, foi descrito uma metodologia de seleção de mutantes usando o reagente de Salkowski onde foram estabelecidas as condições de crescimento e análise de produção AIA para mutantes de *G. diazotrophicus* utilizando o cultivo em microplacas de poliestireno. Os resultados demonstram que a metodologia utilizada permitiu de forma fácil, rápida e com baixo custo a seleção de mutantes com alteração na produção de AIA.

Tabela 1: Porcentagem de variação na produção de AIA por mutantes de *G. diazotrophicus* (Pal 5)

AIA Mutantes	48 horas**			72 horas			115 horas		
	DO <sub>620 nm</sub>	AIA $\mu\text{M/mL}$	%***	DO <sub>620 nm</sub>	AIA $\mu\text{M/mL}$	%	DO <sub>620 nm</sub>	AIA $\mu\text{M/mL}$	%
Mut 24	0,15	322	-46	0,22	215	-59	0,42	246	251
Mut 25	0,15	-20	-103	0,21	-19	-104	--	--	--
Mut 31	0,16	-11	-102	0,22	-24	-105	--	--	--
Mut 34	0,19	-17	-103	0,23	-14	-103	--	--	--
Mut 47	0,30	137	-77	0,30	86	-84	0,2	27	-63
Pal 5	0,17	592	0	0,26	529	0	0,45	70	0,0
Branco*	0,07	-24	-104	--	--	--	--	--	--

\* Meio LGI-P não inoculado; \*\* Tempo de crescimento da bactéria; \*\*\*Variação da produção de AIA em relação a estirpe selvagem Pal5.

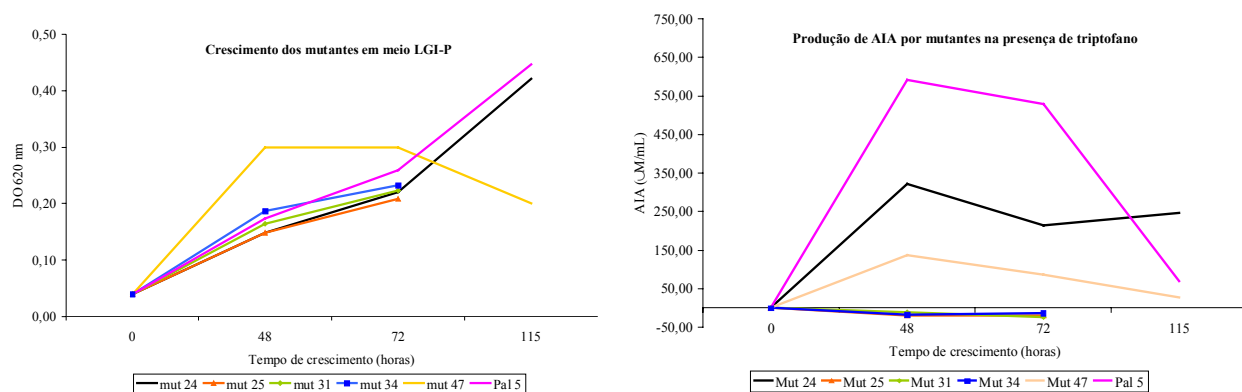


Figura 3 : Curva de crescimento e Produção de AIA por mutantes de *G. diazotrophicus* (Pal 5)

## Agradecimentos

---

PRONEX 2003 CNPq/FAPERJ e CAPES.

## Referências Bibliográficas

---

BASTIAN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 24, p. 7-11, 1998.

CAVALCANTE, V. A.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 108, p. 23-31, 1988.

DÖBEREINER, J.; REIS, V. M.; PAULA, M. A. de; OLIVARES, F. Endophytic diazotrophs in sugar cane, cereals and tuber plants. In: PALACIOS, R.; MORA, J.; NEWTON, W. E. (Ed.). **New horizons in nitrogen fixation**. Dordrecht: Kluwer, 1993. p. 671-676.

FUENTES-RAMIREZ, L. E.; JIMENEZ-SALGADO, T.; ABARCA-OCAMPO, I. R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Acetobacter diazotrophicus*, an indole acetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 154, p. 145-150, 1993.

GILLIS, M.; KERTERS, B.; HOSTE, D. J.; KROPPESTEDT, R. M.; STEPHAN, M. P.; TEIXEIRA, K. R. S.; DÖBEREINER, J.; DE LEY, J. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. **International Journal of Systematics Bacteriology**, Washington, v. 7, p. 361-364, 1989.

GLICKMANN, E.; DESSAUX, A. Critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 2, p. 793-796, feb. 1995.

GORDON, S. A.; WEBER, R. P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**, Baltimore, v. 26, n. 1, p.192-195, 1951.

JIMÉNEZ-SALGADO, T.; APARICIO FABRÉ, R.; CABALLERO-MELLADO, J. Detección de citocininas en *Acetobacter diazotrophicus* aislado de caña de azúcar. In: XVII REUNIÓN LATINOAMERICANA DE RHIZOBIOLOGÍA. **Abstracts...** La Habana, Cuba. 1994.

JIMÉNEZ-SALGADO, T.; FUENTES-RAMIREZ, L. E.; TAPIA-HERNANDEZ, A.; MASCARUA-ESPERANZA, A. M.; MARTINEZ-ROMERO, E.; CABALLERO-MELLADO, J. *Coffea arabica* L., a new host for *Acetobacter diazotrophicus* and isolation of other nitrogen-fixing Acetobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 3676-3683, 1997.

MUÑOZ ROJAS, J.; CABALLERO MELLADO, J. Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and its effect on plant growth. **Microbial Ecology**, New York, v. 46, p. 454-464, 2003,

MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Influence of nitrogen fertilization on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp. from Indian sugarcane varieties. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 29, p. 157-164, 1999.

MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; SESHADRI, S.; LAKSHMINARASIMHAN, C. *Gluconacetobacter diazotrophicus* (syn. *Acetobacter diazotrophicus*), a promising diazotrophic endophyte in tropics. **Current Science**, Bangalore, v. 83, p. 137-145, 2002.

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, J. I. The effect of inoculating endophytic N<sub>2</sub>-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 242, p. 205-215, 2002.

PRINSEN, E.; COSTACURTA, A.; MICHIELS, K.; VANDERLEYDEN, J.; VAN ONCKELEN, H. *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid biosynthesis: evidence for a non-tryptophan dependent pathway. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 6, n. 5, p. 609-615, 1993.

RADWAN, T. E. E.; MOHAMED, Z. K.; REIS, V. M. Production of Indole-3-Acetic Acid by different Strains of *Azospirillum* and *Herbaspirillum* spp. **Symbiosis**, Rehovot, v. 32, p. 39-54, 2002.

REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; DÖBEREINER, J. Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 10, p. 401-405, 1994.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JR., V. A.; VICTOR, O. Meio simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri Tipo B. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 2, p. 16-16, 1986.

ROUWS, L. F. M.; HEMERLY, A. S.; BALDANI, J. I. **Transformação de *Gluconacetobacter diazotrophicus* estirpe Pal 5 pela técnica de eletroporação**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2006. 4 p. (Embrapa-CNPAB. Comunicado técnico, 84).

SARWAR, M.; KREMER R. J. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 20, p. 282-285, 1995.

SEVILLA, M.; BURRIS, R. H.; GUNAPALA, N.; KENNEDY, K. C. Comparison of benefit to sugarcane plant growth and  $^{15}\text{N}_2$  incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-Type and Nif<sup>-</sup> mutant strains. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 14, n. 3, p. 358-366, 2001.

SEVILLA, M.; DE OLIVEIRA, A.; BALDANI, J. I.; KENNEDY, C. Contributions of the bacterial endophyte *Acetobacter diazotrophicus* to sugarcane nutrition: A preliminary study. **Symbiosis**, Rehovot, v. 25, p. 181-191, 1998.

TAPIA-HERNANDEZ, A.; BUSTILLOS-CRISTALES, M. R.; JIMÉNEZ-SALGADO, T.; CABALLERO-MELLADO, J.; FUENTES-RAMÍREZ, L. E. Natural endophytic occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in pineapple plants. **Microbial Ecology**, New York, v. 39, p. 45-55, 2000.

TIEN, T. M.; GASKINS, M. H.; HUBBELL, D. H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 37, p. 1016-1024, 1979.

YAMADA, Y.; HOSHINO, K.; ISHIKAWA, T. The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconacetobacter* to generic level. **International Journal of Systematics Bacteriology**, Washington, v. 48, p. 327-328, 1998.

ZIMMER, W.; ROEBEN, K.; BOTHE, H. An alternative explanation for plant growth promotion by bacteria of the genus *Azospirillum*. **Planta**, New York, v. 176, p. 333-342, 1988.





---

*Agrobiologia*

Ministério da Agricultura,  
Pecuária e Abastecimento

