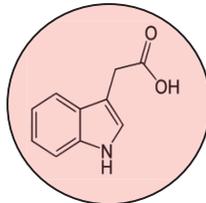
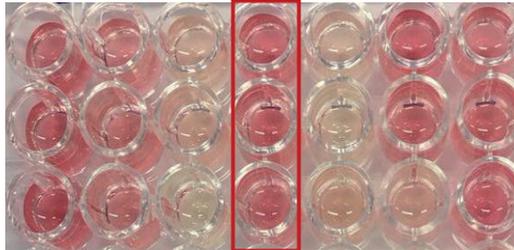
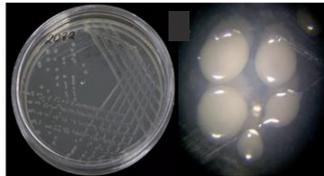


Seleção em Larga Escala de Bactérias Produtoras do Hormônio Ácido Indolacético (AIA), Auxina Associada à Promoção de Crescimento em Plantas



Ácido indolacético

***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento***

Documentos 218

Seleção em Larga Escala de Bactérias Produtoras do Hormônio Ácido Indolacético (AIA), Auxina Associada à Promoção de Crescimento em Plantas

Ubiraci Gomes de Paula Lana
Vitória Palhares Ribeiro
Eliane Aparecida Gomes
Christiane Abreu de Oliveira

Embrapa Milho e Sorgo
Sete Lagoas, MG
2017

Esta publicação está disponível no endereço:
<https://www.embrapa.br/milho-e-sorgo/publicacoes>

Embrapa Milho e Sorgo

Rod. MG 424 Km 45
Caixa Postal 151
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
Fone: (31) 3027-1100
Fax: (31) 3027-1188
www.embrapa.br/fale-conosco

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Sidney Netto Parentoni
Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau
Membros: Antonio Claudio da Silva Barros, Cynthia Maria Borges Damasceno, Maria Lúcia Ferreira Simeone, Roberto dos Santos Trindade, Paulo Eduardo de Aquino Ribeiro, Rosângela Lacerda de Castro

Revisão de texto: Antonio Claudio da Silva Barros
Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro
Tratamento de ilustrações: Tânia Mara Assunção Barbosa
Editoração eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa
Foto(s) da capa: Ubiraci Gomes de Paula

1ª edição

Formato digital (2017)

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) Embrapa Milho e Sorgo

Seleção em larga escala de bactérias produtoras do hormônio ácido indolacético (AIA), auxina associada à promoção de crescimento em plantas / Ubiraci Gomes de Paula Lana et al ... [et al.]. -- Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2017.
12 p. : il. -- (Documentos / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1518-4277; 218).

1. Regulador de crescimento. 2. Hormônio vegetal. 3. Bactéria.
I. Lana, Ubiraci Gomes de Paula. II. Ribeiro, Vitória Palhares. III. Gomes, Eliane Aparecida. IV. Paiva, Christiane Abreu de Oliveira. V. Série.

CDD 631.89 (21. ed.)

© Embrapa 2017

Autores

Ubiraci Gomes de Paula Lana

Químico, D.Sc. em Genética, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Rod MG 424 Km 45, Zona Rural, CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG, ubiraci.lana@embrapa.br;

Vitória Palhares Ribeiro

Graduada em Ciências Biológicas (Licenciatura), Mestranda em Bioengenharia Embrapa Milho e Sorgo, Rod MG 424 Km 45, Zona Rural, CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG, vitypalhares18@hotmail.com

Eliane Aparecida Gomes

Bióloga, DSc. em Genética, Pesquisadora em Microbiologia na Embrapa Milho e Sorgo, Rod MG 424 Km 45, Zona Rural, CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG, eliane.a.gomes@embrapa.br

Christiane Abreu de Oliveira Paiva

Eng.-Agrôn., D.Sc. em Biologia Vegetal, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Rod MG 424 Km 45, Zona Rural, CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG, christiane.paiva@embrapa.br

Apresentação

A produção do fito-hormônio ácido indolacético (AIA) por microrganismos consiste num dos principais mecanismos associados à promoção de crescimento de plantas. A Embrapa Milho e Sorgo possui um Banco de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatogênicos que conta com milhares de cepas, cuja ampla maioria ainda não foi caracterizada quanto ao potencial uso como promotores de crescimento vegetal.

A metodologia adaptada e apresentada neste trabalho foi implementada nos nossos laboratórios como alternativa para quantificação de AIA em larga escala, propiciando maior agilidade na caracterização inicial e seleção de potenciais cepas para uso como bioinoculantes.

Antonio Alvaro Corsetti Purcino

Chefe-Geral

Embrapa Milho e Sorgo

Sumário

Introdução	6
Procedimento	7
Referências	11

Seleção em Larga Escala de Bactérias Produtoras do Hormônio Ácido Indolacético (AIA), Auxina Associada à Promoção de Crescimento em Plantas

Ubiraci Gomes de Paula Lana¹

Vitória Palhares Ribeiro²

Eliane Aparecida Gomes³

Christiane Abreu de Oliveira Paiva⁴

Introdução

Os hormônios vegetais, que incluem as auxinas, citocininas, etileno, giberelinas e ácido abscísico, são substâncias orgânicas que desempenham um papel importante na regulação do crescimento em plantas (RAVEN et al., 2001). Dentre as auxinas, o ácido indolacético (AIA) é o principal fito-hormônio relacionado ao alongamento de células, estimulando a síntese celular ou desinibindo a ação de enzimas que atuam sobre as microfibrilas da parede celular, o que resulta em aumento da plasticidade da membrana, promovendo a formação de raízes adventícias no caule e a expansão radicular (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Além da sua produção em tecidos vegetais, a síntese de AIA pode ocorrer em bactérias associadas a plantas, cuja principal via metabólica de produção utiliza a molécula de triptofano como precursora. A produção de AIA por bactérias endofíticas e epifíticas consiste em um dos principais mecanismos associados à promoção de crescimento de plantas, com

prevalência dos gêneros *Acinetobacter*, *Actinomyces*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Xanthomonas* (PATTEN; GLICK, 1996; TSAVKELOVA et al., 2006).

A Embrapa Milho e Sorgo possui um Banco de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatogênicos, que conta com mais de 10.000 cepas (PAIVA et al., 2013), cuja ampla maioria ainda não foi caracterizada quanto ao potencial uso como promotores de crescimento vegetal. Nesse trabalho apresentamos uma metodologia para seleção em larga escala de bactérias produtoras de AIA baseada no trabalho descrito por Sarwar e Kremer (1995) com modificações e padronizada para as condições e equipamentos disponíveis nos laboratórios do Núcleo de Biologia Aplicada da Embrapa Milho e Sorgo. Esta metodologia foi implementada em nossos laboratórios, permitindo a avaliação em larga escala de um grande número de cepas, propiciando maior agilidade na caracterização inicial e seleção de cepas eficientes na produção de AIA.

Procedimento

1. Distribuir 1 mL de meio TSB (caldo soja tripticaseína) suplementado com DL-triptofano na concentração de 1,0 g/L em placa estéril tipo “deep well” com capacidade para 2,6 mL por poço e 96 amostras. Deixar uma posição da placa somente com meio de cultura TSB com DL- triptofano que corresponderá à amostra em branco da reação. O DL- triptofano atua como precursor na principal via de produção

do AIA e deverá ser adicionado ao meio de cultura antes da autoclavagem.

2. Com o auxílio de ponteiras estéreis ou carimbo, inocular individualmente no meio TSB suplementado com triptofano, colônias bacterianas previamente isoladas a partir de meio de cultura sólido. Caso as amostras em estudo estejam em meio de cultura líquido, inocular 5 μL da cultura bacteriana no meio TSB suplementado com triptofano. Vedar a placa com filme adesivo contendo perfurações por agulha para facilitar a aeração. Cobrir toda a placa com papel laminado para impedir a entrada de luz.
3. Posteriormente, incubar as amostras a 30 °C por 5 dias, com agitação de 100 rpm.
4. Após o período de incubação, centrifugar a placa a 4.000 rpm por 15 minutos.
5. Com o auxílio de micropipeta multicanal, pipetar 100 μL do sobrenadante e transferir para microplaca transparente de 96 poços, código Costar 3799 da marca Corning®.
6. Em seguida, adicionar 100 μL do reagente Salkowski, conforme o protocolo descrito por Gordon e Weber (1951), com algumas modificações. O reagente Salkowski é preparado a partir da mistura de 500 μL da solução aquosa de $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ na concentração de 0,136 g/mL e 24,5 mL de solução aquosa de ácido perclórico 35% (v/v). A mistura do ácido perclórico e água deverá ser realizada lentamente em capela de exaustão, sempre com pequenas adições do ácido sobre a água, para evitar grande liberação de calor.

A solução deverá ser armazenada em geladeira e protegida da luz e poderá ser utilizada por até 2 meses, desde que mantidas as características iniciais.

7. Preparar uma solução aquosa estoque de AIA na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. Armazenar a solução na geladeira, em frasco escuro. Desde que apresente as características iniciais, a solução estoque de AIA poderá ser utilizada por até dois meses.
8. Preparar uma curva padrão com as concentrações aquosas de AIA iguais a 100; 80; 40; 20; 10 e 0 $\mu\text{g/mL}$, que deverá ser utilizada no cálculo da quantidade de AIA produzida por cada amostra. A curva deverá ser realizada em triplicata. Para isso, repetir as etapas 5 e 6 substituindo as amostras pelo padrão.
9. Incubar as amostras em temperatura ambiente, no escuro, por 20 minutos.
10. Após, medir a absorbância a 530 nm no equipamento FLUOstar Omega (BMG LABTECH, Alemanha) utilizando o software Omega - Control (BMG LABTECH, Alemanha) com seleção da microplaca "SBS standard 96". No programa, clicar em "change layout" e definir a posição das amostras na placa. Em seguida, clicar em "start measurement". Para análise dos resultados, utilizar o software Omega Data Analysis (BMG LABTECH, Alemanha) e exportar os dados brutos clicando em "export table to excel".
11. O valor da absorbância apresentado pelas amostras não poderá ser superior ao valor encontrado para o padrão AIA

na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. Caso ocorra, as amostras deverão ser diluídas e a análise repetida.

12. Subtrair o valor de absorvância obtido para a amostra ou padrão do valor do branco (0 $\mu\text{g/mL}$ de AIA).
13. Plotar um gráfico com as concentrações de AIA do padrão no eixo X ($\mu\text{g/mL}$) e o valor médio de absorvância no eixo Y. Calcular a equação da reta ($Y = aX$) e o valor de R^2 que deverá ser superior a 0,98, conforme exemplo na Figura

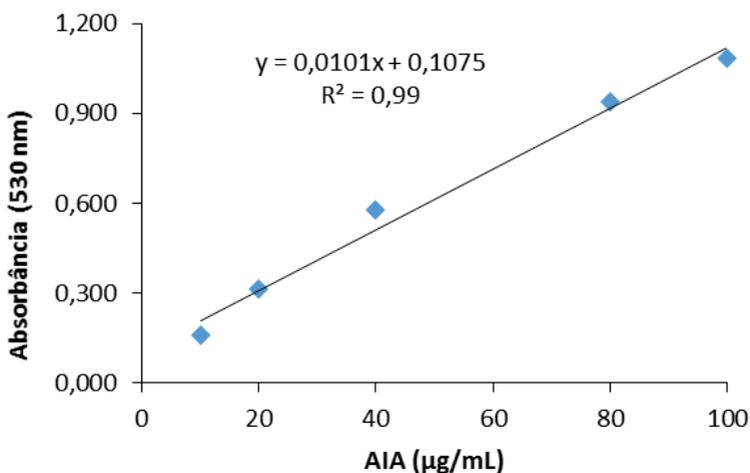


Figura 1. Curva padrão demonstrando a linearidade na faixa de detecção de 0 a 100 $\mu\text{g/mL}$ de AIA por espectrofotometria UV/VIS.

14. Os valores de cada amostra serão calculados com base na equação da reta, em que o valor de y será o valor encontrado a 530 nm e x a concentração de AIA em $\mu\text{g/mL}$.
15. Recomenda-se uma avaliação inicial com apenas uma repetição por amostra em estudo, de forma a permitir uma análise de um grande número de amostras ao mesmo tempo. Esta estratégia pode ser muito útil, por exemplo, na avaliação em larga escala de cepas depositadas em bancos de microrganismos. As bactérias selecionadas com os maiores valores de AIA deverão ser reanalisadas com a realização de pré-inóculo, padronização da densidade ótica (OD) e análise com pelo menos três repetições.

Referências

- GORDON, S. A.; WEBER, R. P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 26, n. 1, p. 192-195, 1951.
- PAIVA, C. A. de O.; OLIVEIRA, M. C.; MARRIEL, I. E.; SOUZA, F. A. de; VALICENTE, F. H.; COTA, L. V. **Manual de Gestão da Coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatogênicos da Embrapa Milho e Sorgo (CMMF)**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2013. 47 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Documentos, 153).
- PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 42, n. 3, p. 207-220, 1996.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. Regulando o crescimento e o desenvolvimento: os hormônios vegetais.

In: RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. (Ed.). **Biologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 646-675.

SARWAR, M.; KREMER, R. J. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 20, n. 5, p. 282-285, 1995.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TSAVKELOVA, E. A.; KLIMOVA, S. Y.; CHERDYNTSEVA, T. A.; NETRUSOV, A. I. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v. 42, n. 2, p. 133-143, 2006.

