



Foto: Jéssica de Paula Ferreira

COMUNICADO  
TÉCNICO

148

Seropédica, RJ  
Junho, 2020



# Método para detecção e quantificação da atividade de ACC deaminase em bactérias diazotróficas promotoras de crescimento vegetal

Jéssica de Paula Ferreira  
Marcia Soares Vidal  
José Ivo Baldani

# Método para detecção e quantificação da atividade de ACC deaminase em bactérias diazotróficas promotoras de crescimento vegetal<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Jéssica de Paula Ferreira, doutoranda no Curso de Pós-graduação em Fitotecnia da UFRRJ, BR 465, km 7, Seropédica/RJ, jeessica\_ufrj@yahoo.com.br. Marcia Soares Vidal, pesquisadora da Embrapa Agrobiologia, BR 465, km 7, Seropédica/RJ, CEP 23890-000, marcia.vidal@embrapa.br. José Ivo Baldani, pesquisador da Embrapa Agrobiologia, BR 465, km 7, Seropédica/RJ, CEP 23890-000, ivo.baldani@embrapa.br.

Entre todos os microrganismos presentes no solo, as bactérias são encontradas em maiores proporções; cerca de  $10^6$  a  $10^9$  células bacterianas podem ser observadas em uma grama de solo rizosférico (BULGARELLI *et al.*, 2013). Tais organismos podem interagir de diferentes maneiras com os vegetais seja de forma positiva, negativa ou até mesmo não causar nenhum efeito (GLICK, 2015; PII *et al.*, 2015). Bactérias que possuem a capacidade de induzir efeitos positivos sobre o crescimento e a aptidão das plantas são denominadas como bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) e dentre elas encontram-se as bactérias diazotróficas associativas e endofíticas (GLICK, 2012). Estas podem ajudar os vegetais a crescerem por meio de processos diretos e/ou indiretos, os quais aliviam ou evitam os efeitos negativos de estresses bióticos e abióticos (GLICK, 2012; LIU; ZHANG, 2015; NUMAN *et al.*, 2018). Dentre os processos realizados pelas BPCV, a ação da enzima 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico

(ACC) deaminase é considerada como um dos principais mecanismos capazes de promover o crescimento vegetal (GLICK, 2014).

A enzima ACC deaminase (E.C. 3.5.99.7) foi descoberta em 1978 por Honma e Shimomura que a identificaram na levedura *Hansenula saturnus* (reclassificada como *Cyberlindnera saturnus*) e na bactéria *Pseudomonas* sp. ACP. Esta importante enzima é codificada pelo gene *acdS* e desde sua descoberta já foi relatada em diversos organismos vivos pertencentes aos domínios Eukarya, Bacteria e Archaea. Contudo, a predominância desta enzima ocorre em diferentes espécies de bactérias e em alguns fungos (SINGH *et al.*, 2015; SONI *et al.*, 2018).

Como já mencionado anteriormente, a atividade da enzima ACC deaminase é apontada como um dos principais mecanismos de promoção de crescimento vegetal e de proteção da planta aos estresses abióticos. Sua importância se dá devido ao seu papel na modulação dos

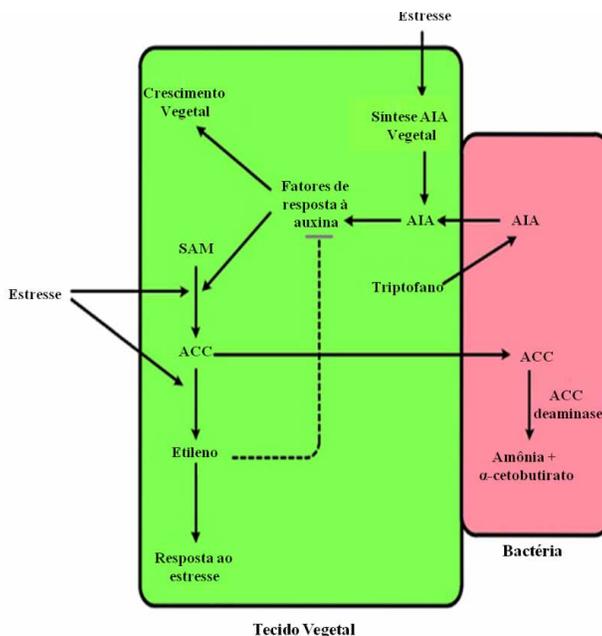
níveis de etileno nas plantas. O etileno é um hormônio vegetal gasoso liberado em resposta a vários estímulos abióticos/bióticos internos e ambientais que regulam diversos processos de crescimento e desenvolvimento das plantas (PEI *et al.*, 2017). Ele atua na regulação de processos como a germinação de sementes e o crescimento da plântula, expansão e diferenciação celular, indução floral, senescência e a abscisão foliar e floral, abscisão e amadurecimento de frutos, crescimento e diferenciação de raízes, além de respostas aos estresses bióticos e abióticos (COLLI, 2004; TAIZ *et al.*, 2017).

Apesar de possuir uma estrutura simples, o etileno ( $C_2H_4$ ) atua como um mediador chave de fatores de estresse bióticos e abióticos (MÜLLER; MUNNÉ-BOSCH, 2015). Sabe-se que os estressores abióticos e bióticos podem levar ao aumento da produção de etileno, comumente chamado de estresse do etileno. Esse estresse é desfavorável aos processos de proliferação de raízes e brotos, causa senescência e abscisão, perda de clorofila, dentre outros processos que, portanto, dificultam o crescimento e desenvolvimento vegetal (DEPAEPE; VAN DER STRAETEN, 2016; GLICK *et al.*, 2007). Além destes efeitos deletérios, o etileno também afeta o processo de nodulação durante a interação entre plantas leguminosas e bactérias simbióticas. Dessa maneira, a ACC deaminase também se torna imprescindível para manutenção do processo de fixação biológica de nitrogênio (NASCIMENTO *et al.*, 2016).

A via biossintética do etileno nas plantas foi elucidada por Adams e Yang (1979). Desse modo sabe-se que o etileno é sintetizado a partir da metionina via S-adenosil-metionina (SAM) e o aminoácido não proteico 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC). Inicialmente S-adenosil-metionina (SAM) é convertido a 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC) por meio da ação da enzima ACC sintase. Posteriormente, o ACC é utilizado como substrato da ACC oxidase, que através de uma reação com consumo de oxigênio produz o etileno (TAIZ *et al.*, 2017).

A ACC deaminase diminui a concentração de etileno através da clivagem do precursor do etileno da planta, ACC, em amônia e  $\alpha$ -cetobutirato (HONMA; SHIMOMURA, 1978). Assim sendo, ao invés de ser utilizado pela enzima ACC oxidase na síntese de etileno, o ACC é usado pela ACC deaminase. Com isso, a concentração de etileno diminui e, conseqüentemente os danos causados pelo mesmo. Com a diminuição nos níveis de etileno, a planta desenvolve uma maior tolerância ao estresse e a inibição do seu crescimento é reduzida (GLICK, 2005, 2014).

Em 1998, Glick *et al.* propuseram um modelo que elucidava o mecanismo realizado pelas bactérias que possuem a ACC deaminase (Figura 1). Segundo o modelo proposto, as BPCVs inicialmente ligam-se à superfície da semente ou raiz em resposta aos exsudatos liberados pelo vegetal, os quais contêm triptofano,



**Figura 1.** Representação esquemática do modo de ação da ACC deaminase. AIA = ácido indol acético; ACC = 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico; SAM = S-adenosil-metionina.

moléculas pequenas como açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos e ACC (GHOSH et al., 2018). O triptofano exsudado pela planta é absorvido pelas bactérias e é usado como um precursor na síntese do ácido indol-3-acético (AIA). Parte do AIA sintetizado pela bactéria é então absorvido pela planta e, em conjunto com AIA e outras auxinas produzidas pela própria planta, estimula a proliferação e/ou alongamento das células vegetais. Alternativamente, o AIA pode estimular a atividade da enzima ACC sintase, aumentando assim a produção de ACC. Parte do ACC produzido pela planta pode ser exsudado e absorvido por bactérias que o convertem

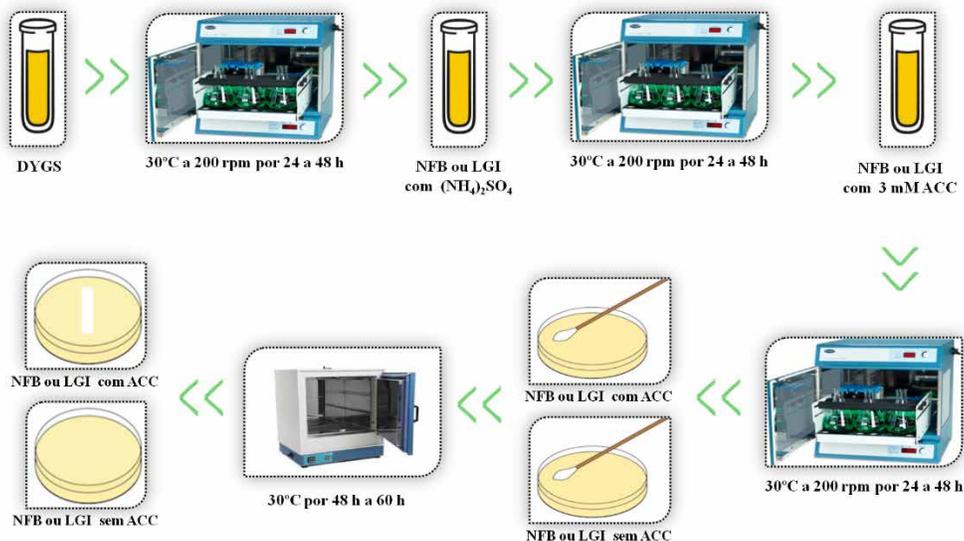
em amônia e  $\alpha$ -cetobutirato por meio da ação da enzima ACC deaminase. Esses dois produtos de reação são utilizados pelas bactérias como fonte de energia e de nitrogênio. A absorção e subsequente hidrólise do ACC pela bactéria diminuem a quantidade de ACC no ambiente externo da planta. Dessa maneira, para que o equilíbrio entre os níveis internos e externos de ACC seja mantido, a planta deve exsudar quantidades crescentes de ACC. Segundo os autores, a bactéria faz com que a planta sintetize mais ACC do que realmente precisa para exsudar o ACC. Desse modo, o ACC exsudado é metabolizado pela bactéria e transformado em uma fonte de nitrogênio.

Com isso, as bactérias que possuem ACC deaminase e metabolizam o ACC, conseguem se desenvolver em condições teciduais onde a disponibilidade de nitrogênio seja mais baixa. Condições estas que outras bactérias do solo não conseguem crescer (GLICK *et al.*, 1998). A partir desse mecanismo, há pelo menos duas consequências diretas resultantes da diminuição do nível de ACC dentro dos tecidos da planta. São elas: a redução da quantidade de etileno da planta, visto que seu precursor foi clivado e, portanto, não encontra-se mais disponível para ser utilizado como substrato; e uma diminuição dos efeitos deletérios desse fitohormônio, como a inibição no alongamento das raízes

vegetais (GLICK *et al.*, 1998). Desse modo, as plantas que interagem com BPCVs que possuem atividade de ACC deaminase geralmente desenvolvem raízes e brotações maiores e acumulam maior biomassa que as ajudam a se adaptar ao ambiente (GHOSH *et al.*, 2018). Além disso, as plantas também possuem maior tolerância ao estresse quando interagem com BPCVs que possuem atividade de ACC deaminase (GLICK, 2005).

O objetivo deste trabalho foi adaptar e aprimorar uma metodologia para detectar a atividade da enzima ACC deaminase em bactérias diazotróficas promotoras de crescimento vegetal.

Autora: Jéssica de Paula Ferreira



**Figura 2.** Modelo esquemático ilustrando a metodologia qualitativa para avaliação da atividade de ACC deaminase.

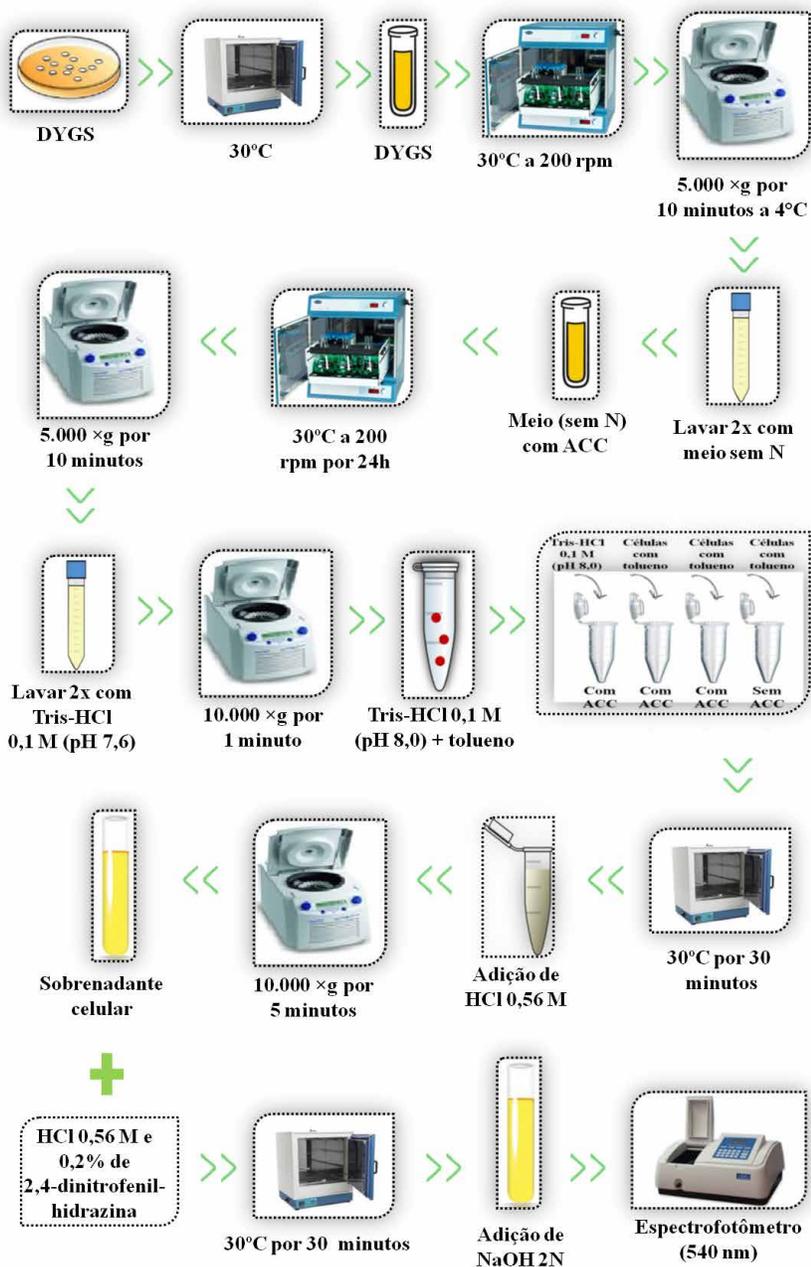
Duas metodologias foram empregadas para avaliar a atividade da enzima ACC deaminase. A primeira metodologia é um método qualitativo adaptado por Glick e colaboradores (1995), que se baseia no fato de que algumas bactérias podem crescer utilizando o composto 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC) como fonte de nitrogênio (Figura 2). A segunda metodologia empregada é considerada a metodologia mais utilizada, já que quantifica o  $\alpha$ -cetobutirato produzido quando a enzima ACC deaminase cliva o ACC (HONMA; SHIMOMURA, 1978; PENROSE; GLICK, 2003). Também se baseia na capacidade da bactéria (com atividade) usar ACC como fonte única de N (Figura 3).

## Método qualitativo para avaliação da atividade de ACC deaminase

Neste comunicado técnico serão empregadas bactérias diazotróficas isoladas de plantas de *Brachiaria*; contudo, essa metodologia de quantificação pode ser utilizada para outras bactérias. Inicialmente, as bactérias foram cultivadas em 5 mL de meio DYGS (RODRIGUES NETO *et al.*, 1986); todavia, na metodologia original as bactérias foram cultivadas primeiro em meio rico (*Tryptic Soybean Broth* - TSB) e, em seguida, transferidas para um

meio mínimo DF (DWORKIN; FOSTER, 1958). As culturas são incubadas por 24 a 48 horas a 30°C sob agitação de 200 rpm. O tempo de incubação é dependente do tempo de crescimento da bactéria. Em seguida, uma alíquota de 100  $\mu$ L de cada cultura é transferida para tubos contendo 5 mL do meio de crescimento da espécie bacteriana. No exemplo apresentado, foram utilizados os meios LGI e NFB (BALDANI *et al.*, 2014; DÖBEREINER *et al.*, 1995) contendo 1 g.L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Os tubos são incubados sob as mesmas condições utilizadas anteriormente e em seguida 100  $\mu$ L são transferidos para novo tubo contendo 5 mL de meio LGI ou NFB, porém sem a fonte de nitrogênio (N). O meio de cultura é suplementado com 3 mM de ACC, que substitui o (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como fonte de N. A cultura é incubada sob as mesmas condições descritas previamente.

Uma solução estoque de ACC 0,5 M (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) preparada com água ultrapura deve ser esterilizada em membrana de 0,22  $\mu$ m. Após a esterilização por filtração, a solução deve ser dividida em alíquotas de 1 mL e congelada a -20°C até o momento do uso. As placas são preparadas com Agar Noble (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA), que é empregado para o preparo de meios de cultivo que necessitam de elevada pureza. No momento do uso, a solução de ACC (3 mM) é descongelada e espalhada sobre a superfície do meio de cultura já solidificado com auxílio de uma alça de Drigalski. Após a



**Figura 3.** Modelo esquemático ilustrando a metodologia quantitativa para avaliação da atividade de ACC deaminase.

secagem da solução de ACC é realizada a semeadura da cultura crescida com auxílio de um cotonete estéril. As placas são então incubadas a 30°C durante 48h ou 60h. Como controle negativo deve ser usado meio de cultura sem ACC e como controle positivo utilizar uma estirpe diazotrófica com atividade de ACC deaminase já caracterizada. Na metodologia aqui descrita utilizamos a estirpe GSF30<sup>T</sup> de *Herbaspirillum frisingense* (BR11790), visto que a atividade de ACC deaminase já foi confirmada nessa estirpe (ROTHBALLER *et al.*, 2008; STRAUB *et al.*, 2013). Em alguns casos, pode-se observar um leve crescimento bacteriano nas placas sem fonte de nitrogênio. Isso pode ocorrer em função do nitrogênio residual presente no inóculo ao ser plaqueado no meio de cultura.

## Método quantitativo para avaliação da atividade de ACC deaminase

### Preparo de curva padrão para atividade de ACC deaminase

Para a quantificação da atividade de ACC deaminase deve ser preparada uma curva padrão de  $\alpha$ -cetobutirato. A concentração de  $\alpha$ -cetobutirato produzida na reação de clivagem de ACC pela ACC deaminase, é determinada comparando-se a absorbância a 540 nm

de uma amostra com a curva padrão de  $\alpha$ -cetobutirato. Uma solução estoque de  $\alpha$ -cetobutirato a 100  $\mu\text{moles.mL}^{-1}$  (100 mM) (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, EUA) é preparada em Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0) e armazenada a 4°C. Pouco antes de usar, a solução estoque é diluída com Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0) para uma concentração de 10 mM a partir da qual a curva de concentração padrão é gerada. Em seguida, os padrões (em  $\mu\text{moles.mL}^{-1}$ ) incluindo 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500 e 1000 são preparados em duplicata em Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0). Feito isso, 500  $\mu\text{L}$  de sobrenadante celular ou 500  $\mu\text{L}$  dos padrões de  $\alpha$ -cetobutirato são adicionados em cada tubo de ensaio de vidro. Posteriormente, 400  $\mu\text{L}$  de HCl 0,56 M e 150  $\mu\text{L}$  de 0,2% de 2,4-dinitrofenil-hidrazina (preparada em HCl 2N) (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, EUA) são acrescentados e submetidos à agitação vigorosa em agitador do tipo vórtex por cerca de 5 segundos. Em seguida, todos os tubos de ensaio são incubados a 30°C durante 30 minutos, seguidos pela adição de 1 mL de NaOH 2N. Os tubos são agitados por cerca de 5 segundos e a absorbância da mistura é medida a 540 nm usando um espectrofotômetro. A mudança de cor de amarelo para marrom indica um resultado positivo.

### Atividade de ACC deaminase

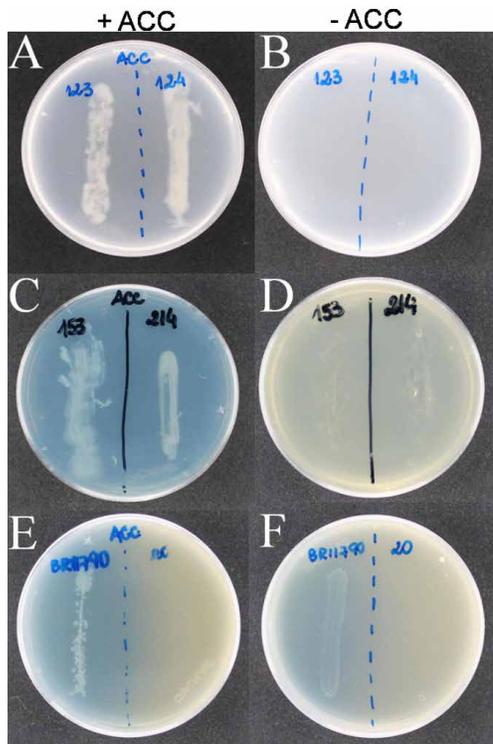
Os isolados bacterianos que apresentarem a capacidade de crescer no meio de cultivo com ACC como única

fonte de nitrogênio serão utilizados na quantificação da atividade enzimática. Para tal, os mesmos são cultivados em placas de meio DYGS e incubados à 30°C até a formação de colônias. Em seguida, uma única colônia é transferida para um frasco com 5 mL de meio DYGS e incubado à 30°C sob agitação de 200 rpm por 24 ou 48h. Células bacterianas de um cultivo na fase exponencial foram recolhidas por centrifugação em centrífuga de bancada com ângulo fixo (Modelo Centrífuga Mikro 200R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Alemanha). As especificações utilizadas na centrifugação foram: rotação a 5.000 ×g durante 10 minutos a 4°C. O sedimento bacteriano é lavado duas vezes com 5 mL do meio específico para o crescimento da bactéria em estudo. Os meios de cultura NFB e LGI (sem nitrogênio na composição) (BALDANI *et al.*, 2014) foram empregados no desenvolvimento da metodologia. Após a lavagem o sedimento bacteriano foi ressuspensão em 5 mL de meio suplementado com 3 mM de ACC. A cultura foi incubada por 24 horas sob agitação de 200 rpm a 30°C seguido de nova centrifugação a 5.000 ×g durante 10 minutos. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com 5 mL de Tris-HCl 0,1 M (pH 7,6) e a suspensão celular foi transferida para um tubo de microcentrifuga de 1,5 mL e centrifugado a 10.000 ×g durante 1 minuto. Todo o sobrenadante é removido e o sedimento celular utilizado para o ensaio da atividade da enzima. O sedimento foi ressuspensão em 400 µL de Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0). Aos 400 µL de suspensão

foram adicionados 20 µL de tolueno. A suspensão foi submetida à agitação vigorosa em agitador do tipo vórtex na velocidade máxima por 30 segundos. Em seguida, alíquotas de 50 µL do produto de lise foram distribuídos em três novos tubos de microcentrifuga de 1,5 mL. Em dois tubos, 5 µL de solução de ACC 0,5 M foram adicionados, enquanto o terceiro tubo foi utilizado como um controle absoluto (produto da lise celular sem ACC). Outro controle também foi preparado contendo 50 µL de Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0) e 5 µL de ACC 0,5 M. Após a adição de ACC, a suspensão celular foi submetida à agitação vigorosa em agitador do tipo vórtex na velocidade máxima por cerca de 5 segundos e todos os tubos foram incubados a 30°C durante 30 minutos. Depois da incubação, 500 µL de HCl 0,56 M foram adicionados em cada tubo que em seguida foram agitados vigorosamente em agitador do tipo vórtex por 5 segundos. As células foram então centrifugadas durante 5 minutos a 10.000 × a temperatura ambiente.

A atividade final de ACC deaminase foi expressa em µmol α-cetobutirato/mg proteína/hora. A proteína de cada amostra deve ser quantificada empregando a metodologia de BRADFORD (BRADFORD, 1976) ou similar.

A figura 4 apresenta resultados referentes à análise qualitativa de atividade da ACC deaminase conforme a metodologia descrita aqui e adaptada de GLICK *et al.* (1995). Algumas bactérias alvo (isolados NRB123, NRB124, NRB153, NRB214) apresentaram crescimento em



**Figura 4.** Placas de Petri contendo meio de cultivo NFB ou LGI suplementados ou não com solução de ACC 0,5 M. **A** = Isolados NRB123 e NRB124 inoculados em meio LGI suplementado com ACC; **B** = Isolados NRB123 e NRB124 inoculados em meio LGI sem ACC; **C** = Isolados NRB153 e NRB214 inoculados em meio NFB suplementado com ACC; **D** = Isolados NRB153 e NRB214 inoculados em meio NFB sem ACC; **E** = Controle positivo *Herbaspirillum frisingense* GSF30<sup>T</sup> (BR11790) e isolado NRB020 inoculados em meio NFB suplementado com ACC e **F** = Controle positivo *Herbaspirillum frisingense* GSF30<sup>T</sup> (BR11790) e isolado NRB020 inoculados em meio NFB sem ACC.

placas contendo os meios LGI ou NFB acrescido de ACC como única fonte de nitrogênio e, portanto, demonstram um forte indício de que estas podem ser consideradas positivas para a atividade de ACC deaminase (Figura 4A e 4C). Entretanto, apenas o ensaio qualitativo não é o suficiente para confirmar que uma bactéria possui atividade de ACC deaminase; para isso torna-se necessário a demonstração da atividade da ACC deaminase (LI *et al.*, 2011). Como controle negativo, estes mesmos isolados, quando cultivados em placas contendo os meios LGI ou NFB sem a adição de

nitrogênio inorgânico e sem adição de ACC não apresentam crescimento considerável (Figura 4B e 4D). O controle positivo (estirpe BR11790) apresentou maior crescimento no meio com ACC e menor no meio sem ACC (Figura 4E e 4F) enquanto que a estirpe sem atividade de ACC deaminase (Estirpe NRB020) não cresceu em ambas condições (Figura 4E e 4F) confirmando o que preconiza a metodologia descrita por GLICK *et al.*, 1995).

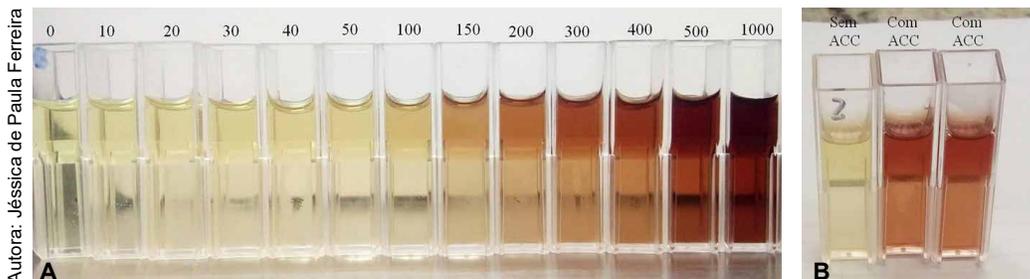
Outra metodologia para avaliar a atividade da enzima ACC deaminase é

a de quantificação de  $\alpha$ -cetobutirato produzido durante a desaminação de ACC pela enzima (PENROSE; GLICK, 2003). A validação da atividade da enzima deve ser realizada com os isolados que apresentaram capacidade de crescimento em meio de cultivo com ACC como única fonte de Nitrogênio. Para isso, deve-se estabelecer uma curva de calibração com  $\alpha$ -cetobutirato, como pode ser observado na Figura 5. A absorbância dos pontos da curva padrão de  $\alpha$ -cetobutirato, assim como das amostras biológicas é medida a 540 nm.

A quantificação da produção de ACC deaminase pelas bactérias diazotróficas usadas como exemplo, mostram que apenas dois dos quatro isolados testados apresentaram atividade ACC deaminase *in vitro* (Tabela 1). O crescimento em meio com ACC como única fonte de nitrogênio, não é uma determinação suficiente para afirmar que um isolado bacteriano possui atividade de ACC deaminase. Nesse sentido, é essencial a

realização da quantificação da atividade da enzima (LI *et al.*, 2011).

O controle positivo como por exemplo o *Herbaspirillum frisingense* GSF30<sup>T</sup> (BR11790) deve sempre exibir a atividade da ACC deaminase. Nesse caso, o mesmo mostra um valor de 9,04  $\mu\text{mol } \alpha\text{-cetobutirato}/(\text{mg de proteína/h})$ , inferior aos isolados 123 e 124 que apresentaram valores de 59,55 e 44,66  $\mu\text{mol } \alpha\text{-cetobutirato}/(\text{mg de proteína/h})$ , respectivamente. Em contrapartida, os isolados 153 e 214 não tiveram atividade enzimática detectada, apesar de terem crescido na placa contendo ACC como fonte de Nitrogênio. Segundo Penrose e Glick (2003) a atividade maior que 20  $\text{nmol de } \alpha\text{-cetobutirato}.\text{mg}^{-1}.\text{h}^{-1}$  é o suficiente para que uma bactéria cresça em meio contendo ACC e atue como bactéria promotora de crescimento vegetal. Nesse sentido, as estirpes avaliadas no presente estudo apresentaram a atividade detectada, e, portanto, apresentam potencial biotecnológico.



**Figura 5.** **A** = Curva padrão de  $\alpha$ -cetobutirato (em  $\mu\text{moles}.\text{mL}^{-1}$ ) contendo diferentes concentrações: 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500 e 1000; **B** = Isolado bacteriano 124 sem ACC (Controle negativo) ou Isolado bacteriano 124 com ACC.

**Tabela 1.** Quantificação da atividade da enzima ACC deaminase em bactérias diazotróficas promotoras de crescimento vegetal.

Código da Estirpe	Identificação taxonômica da bactéria com base no sequenciamento RNAr 16S*	Atividade ACC deaminase ( $\mu\text{mol de } \alpha\text{-cetobutirato)/mg proteína/h}$
NRB123	<i>Nitrospirillum</i> sp.	63,57
NRB124	<i>Paraburkholderia</i> sp.	47,43
BR11790	<i>Herbaspirillum frisingense</i> **	9,28
NRB153	<i>Nitrospirillum</i> sp.	N.D.
NRB214	<i>Flavobacterium</i> sp.	N.D.

N.D. não detectada. \*Ribeiro *et al.* (2019). \*\*Bactéria utilizada como controle positivo.

Bactérias promotoras de crescimento vegetal com atividade de ACC deaminase podem atuar na promoção do crescimento vegetal, bem como promover a mitigação de efeitos bióticos e abióticos. Isso porque tais bactérias não protegem a planta apenas contra o impacto negativo da alta concentração de etileno. Elas também aumentam o crescimento e o desenvolvimento vegetal por vários outros mecanismos, tais como produção de fitohormônios, solubilização de nutrientes, produção de exopolissacarídeos, etc. (GHOSH *et al.*, 2018). Portanto, a utilização de forma eficaz destes organismos requer que a capacidade de realizar a atividade de ACC deaminase seja verificada nas estirpes. Nesse sentido, os procedimentos aqui descritos são um importante ponto de partida para o alcance do objetivo.

## Agradecimentos

Este trabalho foi parcialmente financiado Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) (Projeto No. 02.13.08.004.00.00) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) sob a forma de bolsa de doutorado da primeira autora.

## Referências

- ADAMS, D. O.; YANG, S. F. Ethylene biosynthesis: Identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 1, p. 170-174, 1979.
- BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; VIDEIRA, S. S.; BODDEY, L. H.; BALDANI, V. L. D. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. **Plant and Soil**, v. 384, n. 1-2, p. 413-431, 2014.

- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BRÍGIDO, C.; DUAN, J.; GLICK, B. R. Methods to study 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) Deaminase in plant growth-promoting bacteria. In: CASSÁN, F. D.; OKON, Y.; CREUS, C. M. (Ed.). **Handbook of Azospirillum**: technical issues and protocols. Heidelberg: Springer, 2015. 514 p. p. 287-305, 2015.
- BULGARELLI, D.; SCHLAEPI, K.; SPAEPEN, S.; VAN THEMAAT, E. V. L.; SCHULZE-LEFERT, P. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, n. 1, p. 807-838, 2013.
- COLLI, S. Etileno. In: KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. Cap. 12. p. 308-332.
- DEPAEPE, T.; VAN DER STRAETEN, D. Ethylene. **Encyclopedia of Applied Plant Sciences**, v. 1, p. 403-410, 2016.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, 1995. 60p.
- DWORKIN, M.; FOSTER, J. W. Experiments with some microorganisms which utilize ethane and hydrogen. **Journal of bacteriology**, v. 75, n. 5, p. 592-603, 1958.
- GHOSH, P. K.; DE, T. K.; MAITI, T. K. Role of ACC deaminase as a stress ameliorating enzyme of plant growth-promoting rhizobacteria useful in stress agriculture: a review. In: MEENA, V. S. (Org.). **Role of rhizospheric microbes in soil**. London: Springer, 2018. p. 57-106.
- GLICK, B. R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 109-117, 1995.
- GLICK, B. R. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. **FEMS Microbiology Letters**, v. 251, n. 1, p. 1-7, 2005.
- GLICK, B. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, p. 1-15, 2012.
- GLICK, B. R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. **Microbiological Research**, v. 169, n. 1, p. 30-39, 2014.
- GLICK, B. R. Introduction to plant growth-promoting bacteria. In: GLICK, B. R. **Beneficial plant-bacterial interactions**. London: Springer, 2015. p. 1-28.
- GLICK, B. R.; PENROSE, D. M.; LI, J. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. **Journal of Theoretical Biology**, v. 190, n. 1, p. 63-68, 1998.
- GLICK, B. R.; TODOROVIC, B.; CZARNY, J.; CHENG, Z.; DUAN, J.; MCCONKEY, B. Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 26, p. 227-242, 2007.
- HONMA, M.; SHIMOMURA, T. Metabolism of 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 42, n. 10, p. 1825-1831, 1978.
- LI, Z.; CHANG, S.; LIN, L.; LI, Y.; AN, Q. A colorimetric assay of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) based on ninhydrin reaction for rapid screening of bacteria containing ACC deaminase. **Letters in Applied Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 178-185, 2011.
- LIU, X.-M.; ZHANG, H. The effects of bacterial volatile emissions on plant abiotic stress tolerance. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 16, September, 2015.
- MÜLLER, M.; MUNNÉ-BOSCH, S. Ethylene response factors: a key regulatory hub in hormone and stress signaling. **Plant Physiology**, v. 169, n. 1, p. 32-41, 2015.
- NASCIMENTO, F. X.; BRÍGIDO, C.; GLICK, B. R.; ROSSI, M. J. The role of rhizobial ACC deaminase in the nodulation process of leguminous plants. **International Journal of Agronomy**, Article ID 1369472, p. 1-9, 2016.
- NUMAN, M.; BASHIR, S.; KHAN, Y.; MUMTAZAZ, A.; KHAN, Z.; SHINWARI, Z. K.; KHAN, A. L.; KHAN, A.; AL-HARRASI, A. A. Plant growth promoting bacteria as an alternative strategy for salt tolerance in plants: a review. **Microbiological Research**, v. 209, p. 21-32, 2018.

PEI, H.; WANG, H.; WANG, L.; ZHENG, F.; DONG, C. H. Regulatory function of ethylene in plant responses to drought, cold, and salt stresses. In: PANDEY, G. K. (Ed.). **Mechanism of plant hormone signaling under stress**. London: John Wiley & Sons, 2017. p. 322-344.

PENROSE, D. M.; GLICK, B. R. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. **Physiologia Plantarum**, v. 118, n. 1, p. 10-15, 2003.

PII, Y.; MIMMO, T.; TOMASI, N.; TERZANO, R.; CESCO, S.; CRECCHIO, C. microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process: a review. **Biology and Fertility of Soils**, v. 51, n. 4, p. 403-415, 2015.

RIBEIRO, N. V. da S.; VIDAL, M. S.; BARRIOS, S. C. L.; BALDANI, J. I. Genetic diversity and growth promoting characteristics of diazotrophic bacteria isolated from 20 genotypes of *Brachiaria* spp. **Plant and Soil**, First Online: 27 August 2019.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JUNIOR, V. A.; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri tipo B. **Summa Phytopatológica**, v. 32, n. 12, p. 1-2, 1986.

ROTHBALLER, M.; ECKERT, B.; SCHMID, M.; AGNES FEKETE, A.; SCHLOTTER, M.; LEHNER, A.; POLLMANN, S.; HARTMANN, A. Endophytic root colonization of gramineous plants by *Herbaspirillum frisingense*. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 66, n. 1, p. 85-95, 2008.

SINGH, R. P.; SHELKE, G. M.; KUMAR, A.; JHA, P. N. Biochemistry and genetics of ACC deaminase: A weapon to "stress ethylene" produced in plants. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1-14, September, 2015.

SONI, R.; YADAV, S. K.; RAJPUT, A. S. ACC-deaminase producing Rhizobacteria: Prospects and application as stress busters for stressed agriculture. In: **Microorganisms for Green Revolution**. Singapore: Springer, 2018. p. 161-175.

STRAUB, D.; YANG, H.; LIU, Y.; TSAP, T.; LUDEWIG, U. Root ethylene signalling is involved in *Miscanthus sinensis* growth promotion by the bacterial endophyte *Herbaspirillum frisingense* GSF30 T. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 14, p. 4603-4615, 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MØLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2017. 858 p.

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

**Embrapa Agrobiologia**  
BR465, km7  
Caixa Postal 74505  
CEP 23891-000, Seropédica, RJ  
Fone: (21) 3441-1500  
Fax: (21) 2682-1230  
[www.embrapa.br/agrobiologia](http://www.embrapa.br/agrobiologia)  
[www.embrapa.br/fale-conosco/sac](http://www.embrapa.br/fale-conosco/sac)

1ª edição: 2020  
1ª impressão (2020): Eletrônica



MINISTÉRIO DA  
AGRICULTURA, PECUÁRIA  
E ABASTECIMENTO



Comitê Local de Publicações da Embrapa Agrobiologia

Presidente  
*Bruno José Rodrigues Alves*  
Secretário-Executivo  
*Carmelita do Espírito Santo*

Membros  
*Ednaldo Silva de Araújo, Maria Elizabeth Fernandes Correia, Janaina Ribeiro Costa Rouws, Luc Felicianus Marie Rouws, Luis Cláudio Marques de Oliveira, Luiz Fernando Duarte de Moraes, Marcia Reed Rodrigues Coelho, Nádia Élen Auras*

Normalização bibliográfica  
*Carmelita do Espírito Santo*

Tratamento das ilustrações  
*Maria Christine Saraiva Barbosa*

Projeto gráfico da coleção  
*Carlos Eduardo Felice Barbeiro*

Editoração eletrônica  
*Maria Christine Saraiva Barbosa*

Foto da capa  
*Jéssica de Paula Ferreira*