

# LIBERAÇÃO DE ÁCIDO-3-INDOLACÉTICO (AIA) POR ESTIRPES DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ISOLADAS EM CULTIVARES DE ARROZ IRRIGADO POR INUNDAÇÃO

NUNES, Rosângela S.G.<sup>1</sup>; SCHMATZ, Raquel<sup>2</sup>; GARLET, Cleidir<sup>2</sup>; LUDKE, Willian<sup>2</sup>; PADOIN, Ailson<sup>2</sup>; CHAVES, Bruno<sup>2</sup>, GIACOMINI, Sandro<sup>3</sup>.

Palavras-chave: fitohormônio; auxina; crescimento vegetal, fixação de nitrogênio.

## INTRODUÇÃO

A região em torno das raízes que se encontra sob influência direta do sistema radicular das plantas é chamado de rizosfera e se constitui de uma zona rica em nutrientes em consequência dos exudatos liberados pelas raízes. A população microbiana nessa região é bastante diversa e numerosa, pois encontram neste local fontes de energia e de carbono necessárias para seu crescimento e atividade. Quando benéficas, as bactérias que colonizam o sistema radicular promovem o crescimento vegetal, sendo denominadas de rizobactérias promotoras de crescimento vegetal – “*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*” (PGPR). A capacidade de estimular o crescimento vegetal apresentada por esses organismos tem sido atribuída a mecanismos diretos tais como a fixação biológica de nitrogênio (FBN) e produção de fitohormônios, e indiretos como antagonismo à patógenos (SOUZA; 2001; MARIANO et al., 2004). Se pelo menos uma destas atividades for observada para uma rizobactéria ela pode ser considerada promotora de crescimento vegetal (PATTEN & GLICK, 1996). A auxina é uma classe de fitohormônio que funciona em baixas concentrações, para regular o crescimento e desenvolvimento da planta, ocorrendo na natureza sob a forma de ácido indolacético (AIA) (GRAY & SMITH, 2005).

Pesquisas com bactérias diazotróficas apontam que as plantas de arroz são capazes de formar associações com várias espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio, sendo que alguns desses microrganismos podem ser responsáveis por suprir as plantas com o nitrogênio necessário ao seu crescimento e, também, substâncias promotoras de crescimento (KUSS, et al., 2007).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de produção de ácido-3-indolacético por estirpes de bactérias diazotróficas isoladas a partir de cultivares de arroz irrigado produzidas no estado do Rio Grande do Sul.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotransformações de Carbono e Nitrogênio - LABCEN, localizado na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), durante o mês de Setembro de 2012. Para a realização deste estudo foram utilizadas estirpes de bactérias diazotróficas pertencentes ao Laboratório de Biotransformações de Carbono e Nitrogênio – LABCEN-UFSM, onde estão preservadas. Estas estirpes foram isoladas de cultivares de arroz irrigado produzidas no Rio Grande do Sul, sendo elas: IRGA 416, IRGA 417, IRGA 418, IRGA 422 CL, IRGA 424, IRGA 426 CL, IRGA 428 e Puitá Inta CL, sendo 20

---

<sup>1</sup> Mestranda no Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia, Dept° de solos/CCR; Universidade Federal de Santa Maria, (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil. rosangelagbio@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Acadêmicos do curso de agronomia; Dept° de solos/CCR; Universidade Federal de Santa Maria, (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

<sup>3</sup> Prof. Dr. em Ciência dos Solos; Dept° de solos/CCR; Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

estirpes isoladas do meio NFb, meio semiespecífico para o gênero *Azospirillum*, e 15 isoladas do meio JNfB, semiespecífico para *Herbaspirillum*. Os isolados foram obtidos da raiz e da parte aérea das cultivares, sendo 24 isolados provenientes da raiz e 11 da parte aérea das plantas. 9 isolados são provenientes da cultivar IRGA 428 ( 8 da raiz e 1 da parte aérea), 6 da cultivar Puitá Inta-CL ( 3 da raiz e 3 da parte aérea), 7 da cultivar IRGA 426-CL (5 da raiz e 2 da parte aérea), 6 da cultivar IRGA 418 (1 da raiz e 5 da parte aérea), 2 da cultivar IRGA 417 (raiz), 1 da cultivar IRGA 416 ( parte aérea), 1 da cultivar IRGA 422 (raiz) e 3 provenientes da cultivar IRGA 424 (raiz).

Os isolados foram analisados quanto à produção de ácido-3- indolacético (AIA) através do método de microplaca descrito por Sarwar e Kremer (1995). As bactérias foram cultivadas em meio DYGS líquido por 24 h sob temperatura de 30 °C. Em seguida, uma alíquota de 20 µL da cultura bacteriana resultante foi inoculada em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio DYGS suplementado com L-triptofano como precursor na concentração final de 100 mg mL<sup>-1</sup>.

Os tubos permaneceram no escuro sob agitação de 150 rpm e temperatura de 30 °C. Alíquotas de 1 mL foram retiradas após 48 h de cultivo e centrifugadas a 10.000 rpm por 15 minutos. Em microplacas de 96 poços, uma alíquota de 150 µL do sobrenadante foi misturado a 100 µL do reagente de Salkowski (1 mL de FeCl<sub>3</sub> 0,5 M em 49 mL de ácido perclórico 35%) previamente preparado. As amostras permaneceram no escuro por 30 minutos sob temperatura ambiente e a leitura de absorbância foi feita em leitor de microplaca em um comprimento de onda de 540 nm. A concentração dos compostos indólicos foi estimada utilizando uma curva padrão previamente preparada com quantidades conhecidas de ácido indolacético (25 a 300 mg mL<sup>-1</sup>).

Para normalizar os valores da determinação dos compostos indólicos, o conteúdo de proteínas foi determinado pelo método descrito por Bradford (1976).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os isolados analisados apresentaram habilidade diferenciada quanto à produção do hormônio auxina (AIA) na presença de L-Triptofano, sendo que os valores encontrados para as estirpes avaliadas variaram de 0,87 a 45,56 µg/ml de proteína. (Tabela 1). O isolado 14 foi o que produziu maior quantidade de AIA, sendo este isolado obtido da parte aérea da cultivar Puitá Inta CL (Tabela 1), diferindo significativamente dos outros 35 isolados, seguido dos isolados 29, 31, 24, 26, isolados das cultivares IRGA 426-CL, IRGA 424, IRGA 428 E IRGA 418, respectivamente, que não diferiram estatisticamente entre si. Os isolados 32, 12 e 18, isolados das cultivares IRGA 426, IRGA 428 e IRGA 417, respectivamente, também obtiveram valores elevados na produção de AIA, porém com valores inferiores aos isolados já citados.

Os demais isolados não diferiram estatisticamente entre si. O menor valor encontrado foi o do isolado 17, obtido da raiz da cultivar IRGA 422 CL.

Kuss et al. (2007) avaliaram a produção de AIA, em meio DYGS sem triptofano, por estirpes de *Azospirillum* isoladas de diferentes cultivares de arroz irrigado produzidas no RS e encontraram valores menores que os verificados neste trabalho.

Em estudo realizado por Silveira (2008) 19 amostras de isolados produziram AIA, sendo 04 destes obtidos de arroz de sequeiro e 15 de arroz irrigado, provenientes de diferentes locais das plantas.

Valores compreendidos entre 0,261 e 4,347 µg.mg<sup>-1</sup> de proteína foram encontrados por Viana (2012) em estirpes de bactérias diazotróficas isoladas de arroz em terras altas, revelando valores mais baixos dos encontrados neste trabalho.

Bactérias diazotróficas capazes de produzir AIA podem exercer um papel importante no desenvolvimento das plantas, principalmente nos primeiros estágios de desenvolvimento e no enraizamento, sendo assim de grande importância conhecer, qualificar e quantificar a produção dessas substâncias para estudos de aplicação biotecnológica, com o intuito de

contribuir para a promoção de uma agricultura mais sustentável e menos agressiva ao meio ambiente.

Tabela1- Produção de AIA por estirpes de bactérias diazotróficas isoladas em cultivares de arroz irrigado por inundação cultivadas no Rio Grande do Sul. Santa Maria, RS, 2012.

<b>Isolados</b>	<b>Cultivar</b>	<b>Produção de Auxina (ug/ml de ptn)</b>
ISOLADO 14	PUITÁ INTA-CL	45.56 a
ISOLADO 29	IRGA 426- CL	31.41 b
ISOLADO 31	IRGA 424	27.71 b
ISOLADO 24	IRGA 428	27.29 b
ISOLADO 26	IRGA 418	26.67 b
ISOLADO 32	IRGA 426-CL	21.34 c
ISOLADO 12	IRGA 428	20.65 c
ISOLADO 18	IRGA 417	19.00 c
ISOLADO 33	IRGA 424	13.82 d
ISOLADO 25	IRGA 424	10.97 d
ISOLADO 11	IRGA 418	10.56 d
ISOLADO 30	IRGA 417	9.59 d
ISOLADO 22	IRGA 426-CL	9.51 d
ISOLADO 10	IRGA 428	7.44 d
ISOLADO 19	IRGA 426-CL	7.08 d
ISOLADO 15	PUITÁ INTA-CL	6.94 d
ISOLADO 27	IRGA 428	6.83 d
ISOLADO 28	IRGA 418	6.36 d
ISOLADO 8	IRGA 428	6.07 d
ISOLADO 3	IRGA 428	5.22 d
ISOLADO 16	PUITÁ INTA-CL	4.81 d
ISOLADO 6	PUITÁ INTA-CL	4.69 d
ISOLADO 20	IRGA 428	4.54 d
ISOLADO 1	IRGA 428	4.32 d
ISOLADO 34	IRGA 426	4.17 d
ISOLADO 23	IRGA 418	4.16 d
ISOLADO 4	IRGA 426-CL	3.71 d
ISOLADO 13	IRGA 418	3.63 d
ISOLADO 5	PUITÁ INTA-CL	3.07 d
ISOLADO 2	PUITÁ INTA-CL	2.94 d
ISOLADO 9	IRGA 418	2.79 d
ISOLADO 21	IRGA 426-CL	1.07 d
ISOLADO 35	IRGA 416	0.15 d
ISOLADO 7	IRGA 428	0.26 d

<sup>1</sup>Valores seguidos da mesma letra, dentro da coluna, não diferem entre si, segundo o teste Skott Knot, a 5% de probabilidade.

## CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo indicam que as diferentes estirpes de bactérias diazotróficas testadas são capazes de liberar AIA e que esta liberação difere entre as estirpes. O isolado 14 é o que produz a maior quantidade de AIA e os isolados 7 e 17 são os que liberam os menores valores.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASGHAR, H. N. et al. Relationship in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 35, p. 231-237, 2002.
- ANTOUN, H. et al. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on no-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 204, n.1, p. 57-67, 1998.
- 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.
- BROEK, A.V. Auxins upregulate expression of the indole-3- Pyruvate decarboxylase gene in *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 181, p. 1338-1342, 1999.
- GRAY, E.J.; SMITH, D. L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. **Soil Biology And Biochemistry**, Oxford, v. 37, p. 395-412, 2005.
- KUSS, A.V. et al. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 10, p. 1459-1465, 2007b
- LIESACK, W.; SCHNELL, S.; REVSBECH, N.P. Microbiology of flooded rice paddies. **FEMS Microbiology Reviews**, v.24, p. 625 – 645, 2000.
- MARIANO, R.L.R.; SILVEIRA, E.B.; ASSIS, S.M.P.; GOMES, A.M.A.; NASCIMENTO A.R.P.; DONATO, V.M.T.S.; Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável; Anais da **Academia Pernambucana de Ciência Agrônoma** v. 1, p.89-111 Recife, 2004.
- SARWAR, M.; KREMER, R.J. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria. **Plant and Soil**, v.172, p.261-269, 1995.
- SILVEIRA, E. L. Inoculações de bactérias promotoras de crescimento no cultivo de arroz em solução nutritiva. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal, 2008.
- PATTEN, C. AND B. R. GLICK. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Can. J. Microbiol.** vol.42, p.207-220, 1996.
- VIANA, T.O. Isolamento e inoculação de bactérias diazotróficas em arroz (*Oryza sativa* L.) cultivado em Vitória da Conquista-BA. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Programa de Pós-Graduação de Mestrado em Agronomia, Vitória da Conquista, 2012.