



Produção de Auxina Sob Influência de Diferentes Condições de pH e Salinidade em *Burkholderia gladioli* Endofítica de Cana-de-açúcar

Jéssica Rafaella De Sousa Oliveira⁽²⁾; Maria Camila de Barros Silva⁽³⁾; Maria Betânia Galvão Santos Freire⁽⁴⁾; Júlia Kuklinsky-Sobral⁽⁵⁾

⁽¹⁾ Trabalho executado com recursos do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE). ⁽²⁾ Eng.º Agrônoma e Mestranda pelo Programa de Pós Graduação em Ciência do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE, e-mail: jessica.rso@hotmail.com; ⁽³⁾ Eng.º Agrônoma e Doutoranda pelo Programa de Pós Graduação em Ciência do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE, ⁽⁴⁾ Professor (a) Adjunto (a), Departamento de Agronomia, UFRPE, Rua Dom Manoel de Medeiros, Dois Irmãos, Recife, PE, 52171-900; ⁽⁵⁾ Professora Adjunta, Tutora Bolsista do Grupo PET Biotecnologia, LGBM/UAG/UFRPE

RESUMO: A produção do fitormônio ácido indol acético (AIA) por bactérias, tem sido amplamente estudada para a cana-de-açúcar. Esta produção de AIA pode ser comprometida por fatores ambientais. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl) e diferentes pHs sobre o crescimento e a produção de AIA *in vitro*, de linhagens bacterianas da espécie *Burkholderia gladioli*, isoladas de plantas de cana-de-açúcar cultivadas no estado de Pernambuco. Para tanto, duas linhagens bacterianas endofíticas de *B. gladioli* foram inoculadas em meio TSA acrescido de cinco concentrações de NaCl: 0,1; 1; 10; 25 e 50 g L⁻¹ e de dois pHs: 7,3 e 5,5. O crescimento bacteriano e a produção de AIA foram avaliados através de espectrofotômetro. As leituras ocorreram às 24 e 48 horas após a inoculação. Foi observado que altas concentrações de NaCl influenciam negativamente a produção do ácido indol acético *in vitro*; que a presença de altas concentrações de sal diminui o crescimento bacteriano; e, que o pH ácido influencia negativamente o crescimento e a produção de AIA destas bactérias.

Termos de indexação: ácido indol acético, cloreto de sódio, promoção de crescimento vegetal.

INTRODUÇÃO

O ácido indol acético (AIA) é um fitormônio da classe das auxinas, produzido no meristema apical dos vegetais, e tem a função de promover o crescimento de raízes e caules através do alongamento celular (CENTELLAS et al., 1999). A produção de auxina também pode ser realizada por bactérias; que, quando em associação com as plantas, podem promover o crescimento vegetal (PATTEN & GLICK, 1996). Esta produção de AIA pode ser comprometida por fatores ambientais, pois assim como as plantas, as bactérias apresentam variações na tolerância a estresses.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl) e diferentes pHs no crescimento e na produção de AIA, *in vitro*, de linhagens bacterianas do gênero *Burkholderia*, isoladas de plantas de cana-de-açúcar cultivadas no estado de Pernambuco.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas duas linhagens bacterianas endofíticas produtoras de ácido indol acético (AIA), da espécie *Burkholderia gladioli* (G18 e G19), pertencentes à coleção de culturas microbianas do Laboratório de Genética e Biotecnologia Microbiana (LGBM), da Unidade Acadêmica de Garanhuns/Universidade Federal Rural de Pernambuco (UAG/UFRPE). Tais linhagens foram previamente isoladas em meio LGP-I (DÖBEREINER et al., 1995), sendo a G18 (*B. gladioli*) de colmo da variedade RB 867515, a G19 (*B. gladioli*) de colmo da variedade RB 92579 de plantas de cana-de-açúcar cultivadas na Estação Experimental de cana-de-açúcar de Carpina (EECAC), Carpina/Pernambuco, (7° 51' 03" S e 35° 15' 17" O).

Colônias isoladas das duas linhagens foram inoculadas em meio de cultura *Trypcase Soy Agar* (TSA) acrescido de L-triptofano (5mM), e incubadas a 28°C por 24h sob agitação (120rpm). Após esta etapa, 10 µL da cultura bacteriana foram inoculados em meio TSA acrescido de cinco concentrações de cloreto de sódio (NaCl): 0,1; 1; 10; 25 e 50 g.L⁻¹, e em meio TSA com pH 7,3 e pH 5,5. Em seguida, os inóculos foram incubados a 28°C sob agitação constante (120rpm). As leituras do crescimento bacteriano (densidade ótica - DO) foram realizadas após 24 e 48 horas do inóculo, com o auxílio de um espectrofotômetro no comprimento de onda de 600 nm. O teste foi realizado em triplicata.

Para a verificação da produção de AIA, foram utilizadas as mesmas amostras da leitura da DO. Dois mililitros da cultura bacteriana foram centrifugados a 12.000 rpm por 5 min. Do



sobrenadante obtido, foram retiradas amostras e acrescidas do reagente de Salkowski (2% de FeCl_3 0,5M em 35% (v/v) de ácido perclórico), na proporção de 1,5:0,5. Esta reação foi incubada por 30 min na ausência de luz. Após esta etapa, a leitura da absorbância foi realizada com o em espectrofotômetro a 530 nm. As leituras foram realizadas às 24 e 48 horas após o inóculo e o teste foi realizado em triplicata. Para a confecção da curva de produção de AIA foi utilizada uma curva padrão, previamente obtida através de concentrações da AIA sintético (VETEC) conhecidas (0, 50, 100, 150, 200, 250, 300 e 350 $\mu\text{g.L}^{-1}$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao se observar o crescimento da linhagem G18 de *B. gladioli* (Figura 1A), o melhor desenvolvimento foi na presença de 10 g.L^{-1} de NaCl. Ao se analisar a produção de AIA, pela mesma linhagem (Figura 1B), percebe-se que a relação com o sal é inversa, ou seja, quanto menor a concentração de NaCl, maior a produção de AIA.

Para a linhagem G19, o maior crescimento ocorreu na concentração de 25 g.L^{-1} de NaCl (Figura 2A), apresentando, deste modo, tolerância a salinidade maior do que a linhagem anterior. Porém, nas concentrações de 0,1; 1 e 10 g.L^{-1} o crescimento foi menor que o observado naquele tratamento. O que sugere uma relação muito específica desta linhagem com o sal presente no meio. Mostrando que apesar das linhagens G18 e G19 serem identificadas como da mesma espécie (*B. gladioli*), seus comportamentos na presença de sal são diferentes, sendo característico para cada linhagem.

As linhagens avaliadas tiveram seu crescimento influenciado negativamente na concentração de 50 g.L^{-1} de NaCl. E quanto à produção de AIA, as concentrações que mais inibiram a produção deste fitormônio foram as de 25 e 50 g.L^{-1} de NaCl (Figuras 1 e 2).

Em trabalho realizado por Nóbrega et al. (2004), com bactérias diazotróficas, não houve nenhuma linhagem bacteriana que cresceu na concentração de 50 g.L^{-1} de NaCl. O que se assemelha ao resultado aqui obtido. Contudo, segundo Medeiros et al. (2007), avaliando linhagens fixadoras de nitrogênio quanto à tolerância a salinidade e a temperatura, constataram que houve crescimento bacteriano até 50 g.L^{-1} de NaCl. De acordo com Radwan et al. (2005), a adição de NaCl ao meio de cultura inibiu a produção de auxina nas linhagens de *Azospirillum* e *Herbaspirillum seropedicae*, em doses superiores a 5 g.L^{-1} .

Quanto a influência do pH sobre o crescimento bacteriano, a linhagem G18 (Figuras 3A) foi

influenciada negativamente pelo pH 5,5, enquanto a linhagem G19 (Figura 4A), cresceu mais lentamente em pH 5,5, porém se tornou praticamente igual ao crescimento em pH 7,3 na leitura de 48 horas.

Quanto a produção de AIA, a linhagem G18 (Figura 3B) obteve menor produção no pH 5,5, e a linhagem G19 (Figura 4B) não apresentou influência do pH, produzindo as mesmas concentrações de AIA em pH 7,3 e pH 5,5.

De modo geral, o pH 5,5 apresentou maior influência negativa sobre as características observadas, quanto ao crescimento e a produção de AIA. Este resultado difere do encontrado por Campos et al. (2010), pois eles demonstraram que o pH alcalino foi mais prejudicial ao crescimento dos isolados de nódulos de raiz e caule de *Discolobium* spp., que o pH ácido.

CONCLUSÕES

Altas concentrações de NaCl influenciam negativamente a produção do ácido indol acético *in vitro*.

A espécie *B. gladioli* apresentou tolerância a salinidade *in vitro*, na presença de até 25 g.L^{-1} de NaCl.

A presença de altas concentrações de sal diminui o crescimento bacteriano de *B. gladioli* produtoras de AIA associadas a cana-de-açúcar.

O pH ácido influencia negativamente o crescimento e a produção de AIA em linhagens do gênero *Burkholderia*.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq, a FACEPE e ao MEC/SESu – Programa de Educação Tutorial pelas bolsas e apoio financeiro; e, ao grupo do Laboratório de Genética e Biotecnologia Microbiana da UAG/UFRPE.

REFERÊNCIAS

- BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; BALDANI, V. L. D.; DOBEREINER, J. A brief story of nitrogen fixation in sugarcane – reasons for success in Brazil. **Functional Plant Biology**, v. 29, p. 417-423, 2002.
- CAMPOS, L. L.; MARTINS, M. E.; ELIAS NETO, N.; LOUREIRO, M. F. Caracterização fisiológica de rizóbios isolados de nódulos de raiz e caule de *Discolobium* spp.. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 9, n. 3, p 75-84, 2010.
- CENTELLAS, A. Q.; FORTES, G. R. L.; MÜLLER, N. T. G.; ZANOL, G. C.; FLORES, R.; GOTTINARI, R. A. Efeito de auxinas sintéticas no enraizamento *in vitro* da macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 2, p. 181-186, 1999.



DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.
Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília, EMBRAPA-SPI; Itaguaí, EMBRAPA-CNPAB, 1995. 60p.

MEDEIROS, E.V.; SILVA, K.J.P.; MARTINS, C.M.; BORGES, W.L. Tolerância de bactérias fixadoras de nitrogênio provenientes de municípios do Rio Grande do Norte à temperatura e a salinidade. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 7, n. 2, p.159-168, 2007.

NÓBREGA, R.S.A.; MOTTA, J.S.; LACERDA, A.M. e MOREIRA, F.M.S. Tolerância de bactérias diazotróficas simbióticas à salinidade *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 4, p. 899-905, 2004.

PATTEN, C.L.; GLICK, B.R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 207-220, 1996.

RADWAN, T.E.E.; MOHAMED, Z.K. e REIS, V.M. Aeração e adição de sais na produção de ácido indol acético por bactérias diazotróficas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 10, p. 997-1004, 2005.

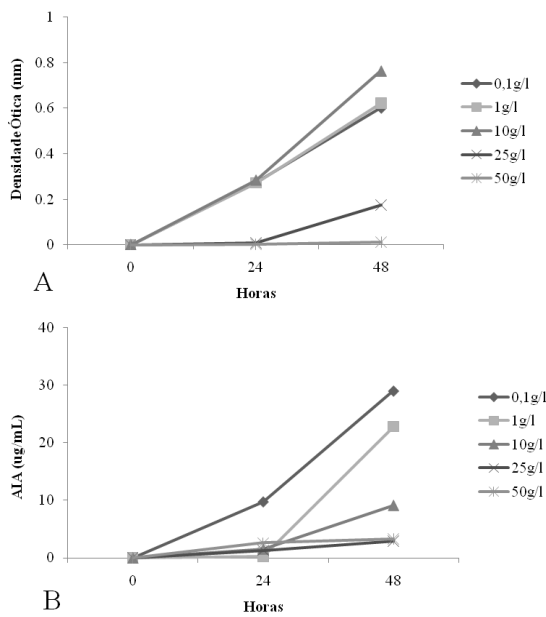


Figura 1. Linhagem G18 de *Burkholderia gladioli* endofítica de cana-de-açúcar. **A)** Crescimento bacteriano; e **B)** Produção de ácido indol acético da linhagem; sob diferentes concentrações de NaCl: 0,1; 1; 10; 25 e 50 g.L⁻¹.

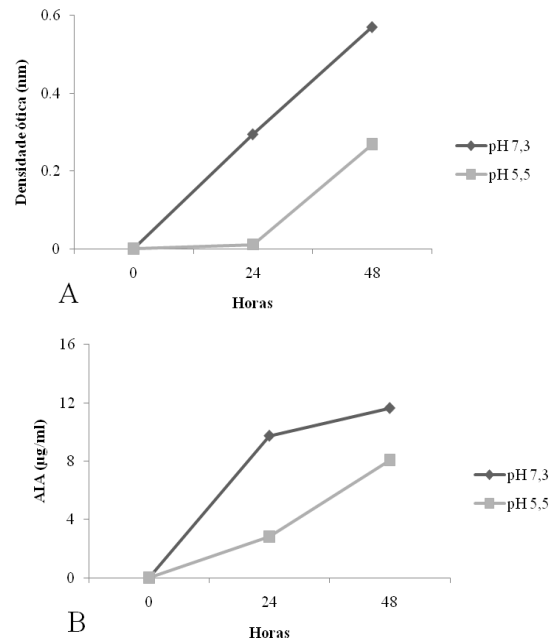


Figura 3. Linhagem G18 de *Burkholderia gladioli* endofítica de cana-de-açúcar. **A)** Crescimento bacteriano; e **B)** Produção de ácido indol acético da linhagem; sob diferentes pHs: 5,5 e 7,3.

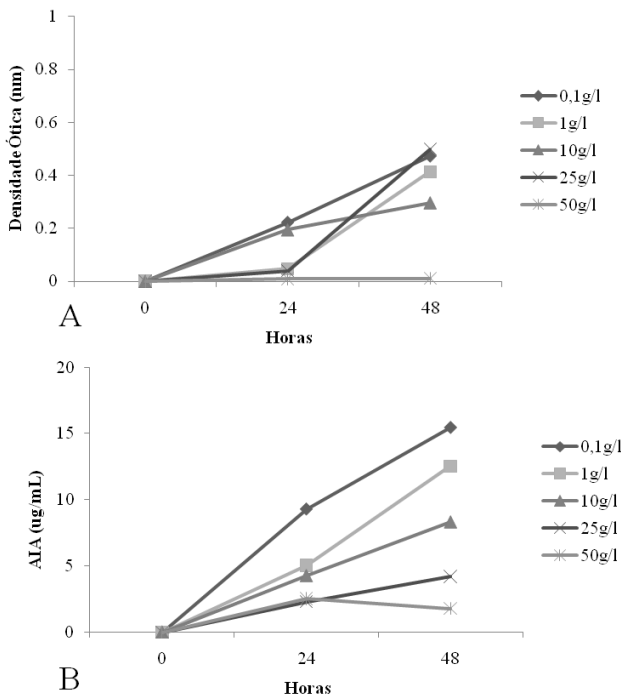


Figura 2. Linhagem G19 de *Burkholderia gladioli* endofítica de cana-de-açúcar. **A)** Crescimento bacteriano; e **B)** Produção de ácido indol acético da linhagem; sob diferentes concentrações de NaCl: 0,1; 1; 10; 25 e 50 g.L⁻¹.

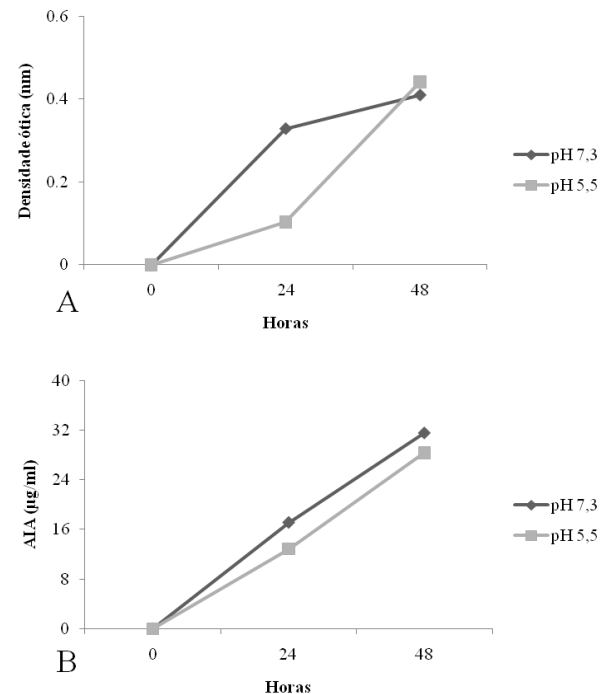


Figura 4. Linhagem G19 de *Burkholderia gladioli* endofítica de cana-de-açúcar. **A)** Crescimento bacteriano; e **B)** Produção de ácido indol acético da linhagem; sob diferentes pHs: 5,5 e 7,3.

