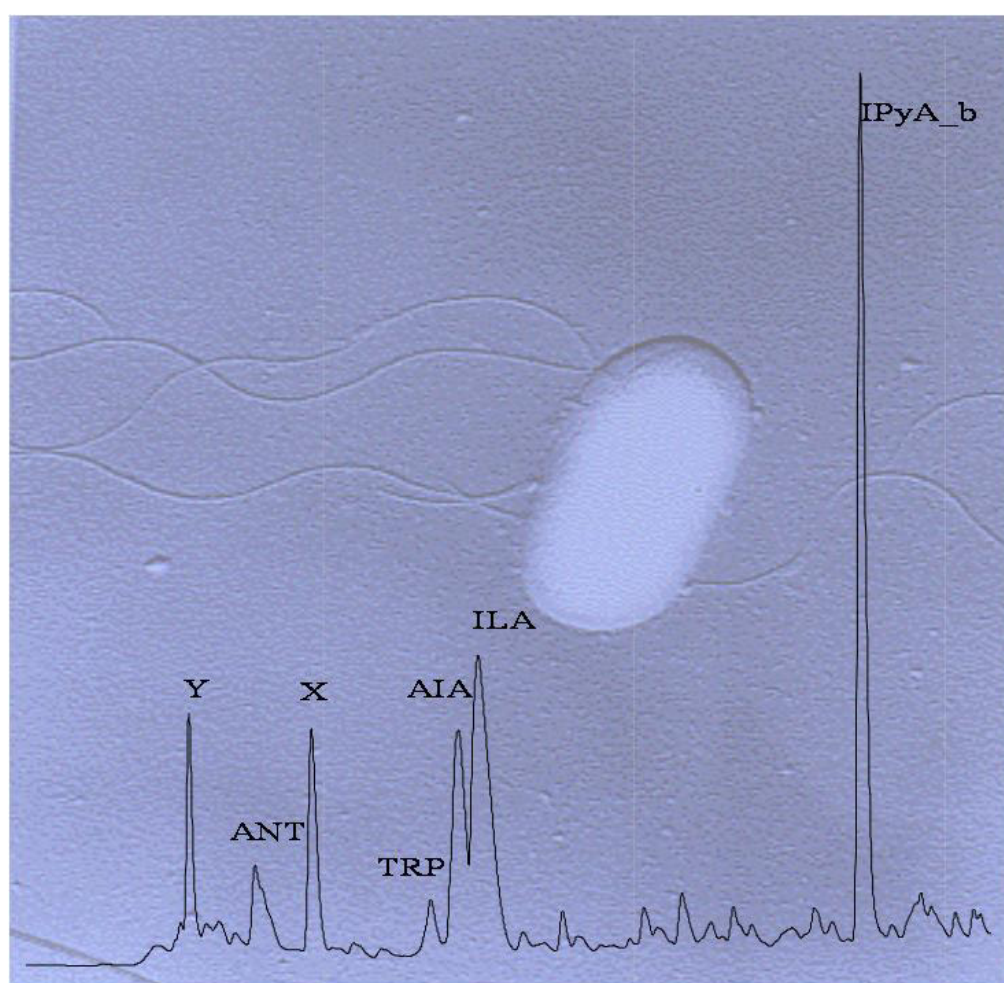


Boletim de Pesquisa 52 e Desenvolvimento

ISSN 1676-6709
Dezembro/2009

Identificação e quantificação de compostos indólicos no sobrenadante de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, cultivada em meio líquido, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)





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

ISSN 1676-6709

Dezembro/2009

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 52

Identificação e quantificação de compostos indólicos no sobrenadante de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, cultivada em meio líquido, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Elisete Pains Rodrigues
Monalisa Santana Coelho
Cleiton de Paula Soares
Marcia Soares Vidal
Jean Luiz Simões Araújo
José Ivo Baldani

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Agrobiologia

BR 465 – km 7

Caixa Postal 74505

23851-970 – Seropédica/RJ, Brasil

Telefone: (0xx21) 3441-1500

Fax: (0xx21) 2682-1230

Home page: www.cnpab.embrapa.br

e-mail: sac@cnpab.embrapa.br

Comitê Local de Publicações: Norma Gouvea Rumjanek (Presidente)

José Ivo Baldani

Guilherme Montandon Chaer

Luis Henrique Barros Soares

Bruno José Rodrigues Alves

Ednaldo Araújo

Carmelita do Espírito Santo (Bibliotecária)

Expediente:

Revisores e/ou ad hoc: Luiz Henrique Barros Soares e Veronica Massena Reis

Normalização Bibliográfica: Carmelita do Espírito Santo

Editoração eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia

1ª impressão (2009): 50 exemplares

118

Identificação e quantificação de compostos indólicos no sobrenadante de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, cultivada em meio líquido, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) / Elisete Pains Rodrigues et al. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2009. 25 p. (Embrapa Agrobiologia. Boletim de Pesquisa & Desenvolvimento, 52).

ISSN 1676-6709

1. Bactéria diazotrófica. 2. Auxina. I. Coelho, Monalisa Santana. II. Soares, Cleiton de Paula. III. Vidal, Marcia Soares. IV. Araújo, Jean Luiz Simões. V. Baldani, José Ivo. VI. Título. VII. Embrapa Agrobiologia. VIII. Série.

CDD 632.32

Autores

Elisete Pains Rodrigues

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

Monalisa Santana Coelho

Analista da Embrapa Agrobiologia, Química, BR 465, km 7, Seropédica/RJ. CEP 23890-000. E-mail: monalisa@cnpab.embrapa.br

Cleiton de Paula Soares

Mestrando em Biotecnologia Vegetal, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro. E-mail: cleitinho.depaula@gmail.com

Marcia Soares Vidal

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

Jean Luiz Simões Araújo

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

José Ivo Baldani

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

SUMÁRIO

Resumo.....	7
Abstract.....	8
Introdução	9
Material e Métodos.....	11
Resultados e Discussão	14
Conclusões	22
Referências Bibliográficas	22

Identificação e quantificação de compostos indólicos no sobrenadante de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, cultivada em meio líquido, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

*Elisete Pains Rodrigues
Monalisa Santana Coelho
Cleiton de Paula Soares
Marcia Soares Vidal
Jean Luiz Simões Araújo
José Ivo Baldani*

Resumo

A espécie *Gluconacetobacter diazotrophicus* é uma bactéria endofítica reconhecida pela sua capacidade de fixação biológica de nitrogênio (FBN) em associação com a cultura de cana-de-açúcar. Além da FBN, a produção de auxinas tem sido considerada como um fator adicional na promoção do crescimento desta cultura. Neste estudo, foi descrita uma metodologia para a identificação e quantificação de compostos indólicos presentes no sobrenadante de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, crescida em meio líquido, utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e extração em fase sólida (SPE). Com esta metodologia foi possível realizar a detecção por HPLC de ácido indol pirúvico no sobrenadante de *G. diazotrophicus* sugerindo que a rota do IPyA foi utilizada na biossíntese de AIA condições testadas.

Termos para indexação: bactéria diazotrófica, auxina, HPLC, Salkowski, AIA

Abstract

Gluconacetobacter diazotrophicus is an endophytic diazotrophic bacteria known by its capacity to fix nitrogen en association with sugarcane crop. Besides that, auxin production has been considered as an additional factor involved in growth promotion of this crop. In this study we described a methodology for identification and quantification of indol compounds in the supernatant of *Gluconacetobacter diazotrophicus*, grown in liquid media, using the high performance liquid chromatography (HPLC) and Solid Phase Extraction techniques. The detection of IpyA in the *G. diazotrophicus* supernatant by this HPLC methodology suggest that Indole-3-pyruvic acid pathway is responsible for IAA biosynthesis in this conditions.

Key-words: diazotrophic bacteria, Auxin, HPLC

Introdução

A produção de auxinas é uma característica comum observada em bactérias associativas promotoras do crescimento vegetal. A auxina bacteriana está envolvida na interação entre a planta e a bactéria, sendo os efeitos nesta associação variáveis podendo ser observado desde uma interação patogênica como no caso de *Agrobacterium tumefaciens* a uma interação benéfica como em espécies do gênero *Azospirillum* (PATEN e GLICK, 1995; COSTACURTA e VANDERLEYDEN, 1996; SPAEPEN et al., 2007). Em *Azospirillum* os efeitos resultantes da inoculação, tais como, as alterações no desenvolvimento do sistema radicular, na absorção de nutrientes e no acúmulo de biomassa pela planta, têm sido relacionados principalmente à produção de auxinas (BASHAN e LEVANONY, 1990; DOBELLAERE et al., 1999). Deste modo, estudos que propiciem um melhor entendimento sobre a biossíntese deste fitormônio e sua função na interação planta-bactéria devem ser enfatizados.

A biossíntese de AIA ocorre a partir do aminoácido L-triptofano, sendo descrito em bactérias a existência de pelo menos cinco rotas de biossíntese utilizando este precursor, as quais são nomeadas pelos seus intermediários, como indol-3-acetamida (IAM), indol-3-acetonitrila (IAN), indol-3-piruvato (IPyA), triptamina (TAM) e oxidase da cadeia lateral do triptofano (TSO) (PATEN & GLICK, 1995; WOODWARD e BATEL, 2005; SPAEPEN et al., 2007). Além destas, também foi observado a presença de uma rota independente de triptofano em *Azospirillum* (PRINSEN et al., 1991) (Figura 1).

A espécie *Gluconacetobacter diazotrophicus* (CAVALCANTE e DÖBEREINER, 1988) é uma bactéria endofítica de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) de grande importância para o crescimento desta cultura devido principalmente aos benefícios derivados da fixação biológica de nitrogênio (FBN) (MUTHUKUMARASAMY et al., 2002; BALDANI, J. e BALDANI, V. 2005). Além da contribuição resultante da FBN, a inoculação com mutantes defectivos na capacidade de fixar nitrogênio (*nif*⁻) mostrou que a promoção do crescimento da cana-de-açúcar por *G. diazotrophicus* pode envolver outros mecanismos. Dentre estes, a produção de ácido-3-indol acético (AIA) tem sido considerada como este fator adicional; entretanto, poucos estudos têm enfatizado a biossíntese de AIA nesta bactéria (SEVILLA et al., 2001).

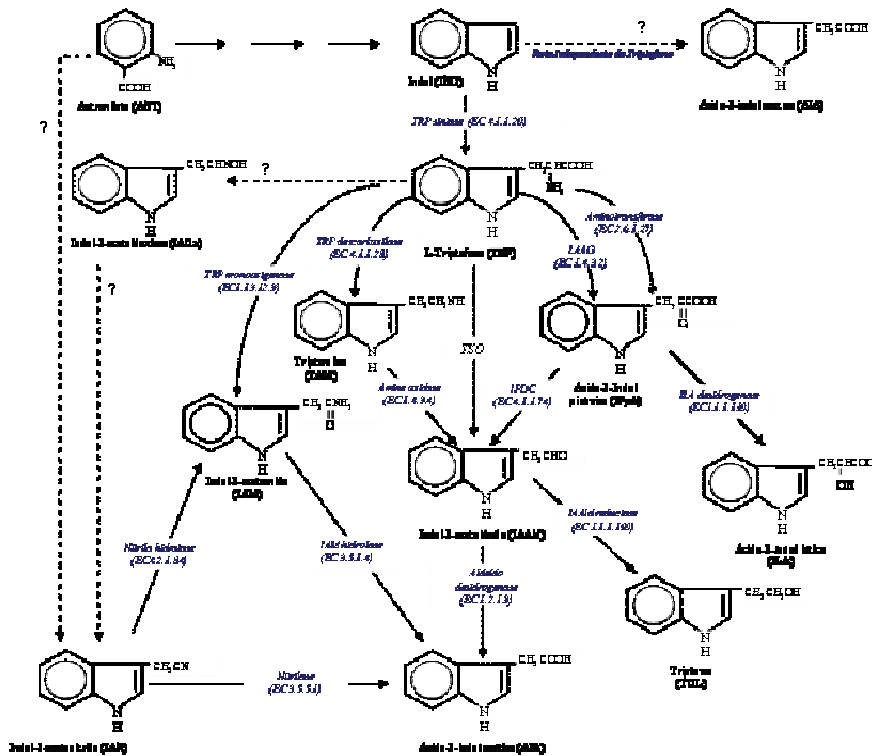


Figura 1: Rotas e enzimas envolvidas na biossíntese de AIA em bactérias (Adaptado de PATTEN e GLICK, 1996).

Uma das etapas iniciais em estudos com bactérias produtoras de auxinas é a detecção destes compostos na cultura bacteriana. O método colorimétrico com o reagente de Salkowski (GORDON e WEBER, 1951) tem sido muito utilizado em estudos de detecção e quantificação de auxinas em bactérias devidas principalmente a sua praticidade, rapidez, especificidade e eficiência (SAWAR e KREMER, 1995; GLICKMANN e DESSAUX, 1995). Este método tem sido aplicado em ensaios de rotina para a detecção de auxinas no sobrenadante da cultura, sendo bastante útil também para estimar a produção de compostos indólicos já que com a utilização de uma curva de calibração a quantidade de compostos indólicos totais na amostra pode ser obtida.

Para um estudo mais específico onde se pretende conhecer a identidade dos compostos indólicos presentes na mistura, tornam-se necessárias técnicas cromatográficas, tais como, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Esta técnica permite além da separação dos compostos indólicos, a identificação e quantificação de cada um dele destes por comparação entre os tempos de retenção na coluna de padrões sintéticos destes compostos indólicos, analisados

por pelo menos duas fases móveis diferentes com construção de curvas de calibração para cada um dos padrões. Além disso, a técnica de extração em fase sólida (SPE) é uma forma de eliminar a matriz indesejável das amostras que contêm substratos do meio de cultura e outros interferentes, realizando uma limpeza das amostras e concentrando os analitos que são encontrados muito diluídos no meio de cultura. Portanto, o uso destas técnicas é imprescindível quando se pretende estudar a biossíntese de auxinas em bactérias já que por meio destas análises os intermediários das vias biossintéticas podem ser separados, identificados e quantificados.

Este trabalho descreve, portanto, uma metodologia de extração, identificação e quantificação de compostos indólicos, produzidos pela bactéria *G. diazotrophicus*, utilizando HPLC.

Material e Métodos

A identificação dos compostos indólicos da amostra foi obtida pela comparação entre os tempos de retenção dos compostos nos cromatogramas das amostras com os cromatogramas de padrões de compostos indólicos sintéticos. Para isto, 12 padrões de compostos indólicos sintéticos foram analisados nas mesmas condições de análise da amostra (Tabela 1).

Para as análises, os 12 compostos foram pesados e dissolvidos em solvente orgânico exceto o triptofano o qual foi dissolvido em água com adição de gotas de NaOH 1 M até a completa solubilização, sendo posteriormente preparada uma mistura contendo 20 µg de cada um deles.

No estabelecimento das condições cromatográficas, esta mistura foi analisada por dois métodos diferentes: um gradiente com de acetonitrila:água ácida (água milliQ com 1% de ácido acético, pH 3,0) - Método 1 e gradiente com metanol: tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e Na_2HPO_4 , pH 7,0) - Método 2.

Tabela 1: Padrões de compostos indólicos sintéticos.

Composto indólico	Sigla utilizada no texto
Antranilato	ANT
L-triptofano	TRP
Ácido-3-Indol Acético	AIA
Ácido-3- Indol Láctico	ILA
Indol-3-Etanolamina ou Triptamina	TAM
Indol-3-Ácido Propiônico	IPA
Indol-3-Acetamida	IAM
Indol-3-Ácido Pirúvico	IPyA
Indol-3-Ácido Butírico	IBA
Indol-3-Etanol ou Triptofol	TOL
Indol-3-Acetonitrila	IAN
Indol	IND

Após estabelecimento do melhor sistema de solvente procedeu-se a padronização do sistema de extração. Para isso, foram avaliados dois tipos de cartuchos de extração em fase sólida ou *Solid Phase Extraction* (SPE; Phenomenex): (1) SPE-Strata™-X, 500 mg/6 ml, 33 µm e (2) SPE-C18, 500 mg/6 ml, 33 µm. A mistura de compostos indólicos (20 µg/cada) foi adicionada a 20 ml de meio LGI-P (DÖBEREINER et al., 1995) e, imediatamente submetida a extração. Antes do carregamento da amostra, o cartucho foi ativado com 20 ml de metanol e equilibrado com 10 ml de tampão fosfato pH 7,0 ou água ácida (conforme o sistema de solvente). Após estas etapas foi adicionado em cada cartucho de SPE 10 ml do meio LGI-P contendo os compostos indólicos a serem extraídos. Em seguida, o cartucho foi lavado com 10 ml de tampão fosfato pH 7,0 ou água ácida. Os compostos indólicos retidos no cartucho foram eluídos com 10 ml de metanol e, em seguida, concentrados sob vácuo (*Centrivap concentrator*, Labconco) à 37°C até 1 ml de volume (Figura 2).

Para a quantificação foram preparadas soluções-padrão com cinco diferentes concentrações de cada padrão de composto indólico e analisadas por HPLC. As unidades de área obtidas sob os picos em cada ponto (concentração) dos padrões de compostos indólicos foram utilizadas para construir curvas de calibração e, as equações originadas destas curvas foram utilizadas para calcular a quantidade do respectivo composto nas amostras de sobrenadante das culturas bacterianas.

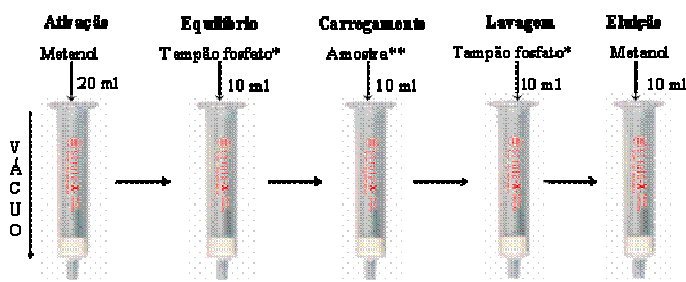


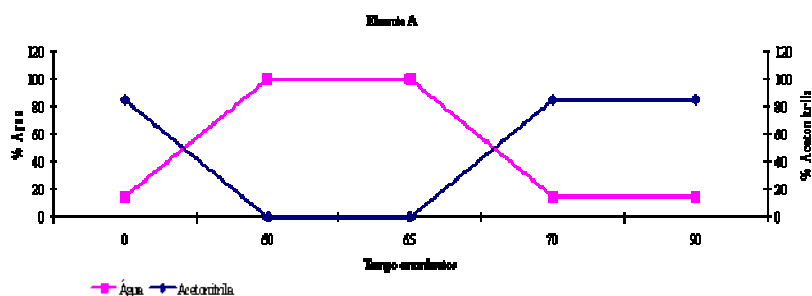
Figura 2: Extração de compostos indólicos utilizando o sistema de extração em fase sólida (SPE).

*O tampão de equilíbrio e lavagem pode ser alterado conforme o sistema de solventes utilizado.

**Na análise do sobrenadante da cultura a quantidade de amostra carregada no cartucho foi 20 ml

Para a análise de auxinas produzidas por *G. diazotrophicus* a estirpe selvagem PAL5^T foi cultivada em meio LGI-P líquido na presença ou ausência de L-triptofano ($100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) sob agitação constante de 200 rpm a 30°C . Após 16 e 60 horas de cultivo foram coletadas alíquotas de 20 ml de cultura. Estas amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 8.228 xg e 4°C e o sobrenadante obtido foi imediatamente utilizado para a extração dos compostos indólicos conforme descrito acima utilizando um cartucho de SPE Strata-XTM.

Os extratos metanólicos contendo os compostos indólicos foram concentrados em centrífuga evaporadora a vácuo até o volume de 1 ml e analisados em uma coluna Luna C-18 (30 cm \times 3,9 mm, tamanho da partícula 5 μm , tamanho do poro 100 Å, área de superfície $440 \text{ m}^2/\text{g}$ Phenomenex) utilizando o equipamento de HPLC LC10-A (Shimadzu). Alíquotas de 50 μl foram injetadas e eluídos em um gradiente de acetonitrila:água ácida pH 3,0 (vol:vol) em 60 minutos (Figura 3A) e um gradiente de metanol:tampão pH 7,0 (vol:vol) em 40 minutos (Figura 3B) nas seguintes condições cromatográficas: temperatura de injeção 25°C , volume de injeção 50 μl , fluxo de 0,5 ml/minuto, detecção por ultravioleta a 254 nm e pressão de 2200 psi.



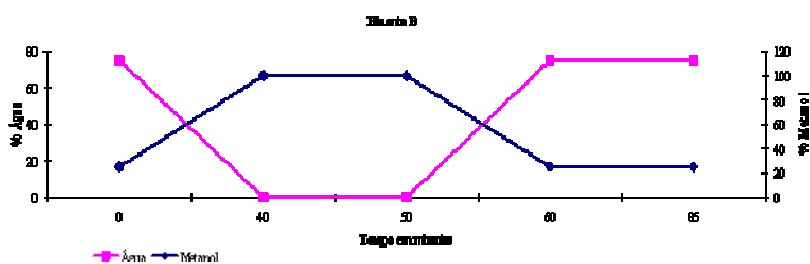


Figura 3: Condições de análise por HPLC com o Método 1 (gradiente de acetonitrila: água MilliQ ácida pH 3,0) e com o Método 2 (gradiente de metanol:tampão fosfato pH 7,0).

Resultados e Discussão

A identificação dos compostos indólicos no sobrenadante de *G. diazotrophicus* foi realizada por comparação com o tempo de retenção de auxinas sintéticas utilizando as mesmas condições de cromatografia. Assim, uma mistura de 12 compostos indólicos (precursores e intermediários das rotas de biossíntese de AIA conhecidas) foi analisada por HPLC utilizando dois sistemas de fase móvel, conforme descrito na seção material e métodos. Cada um dos compostos foi posteriormente injetado separadamente e por comparação entre os tempos de retenção os mesmos foram identificados possibilitando estabelecer o tempo de retenção de cada composto da mistura (Tabela 2).

Tabela 2: Tempo de retenção de 12 compostos indólicos observado pela análise por HPLC utilizando duas condições de fase móvel (Método 1 e Método 2)*

Composto indólico	Sigla	Tempo de retenção (minutos)	
		Método 1	Método 2
Antranilato	ANT	22,74	8,19
L-Triptofano	TRP	8,93	13,46
ÁCIDO-3-INDOL ACÉTICO	AIA	27,33	14,43
Indol-3-Ácido Lático	ILA	23,35	15,18
Triptamina	TAM	5,74	17,36
Ácido-3-Indol Pirúvico	IPyA	26,43 (IPyA_b)	18,56 (IPyA_a)
Indo-3-Ácido Pirúvico	IPyA	30,95 (IPyA_b')	27,39 (IPyA_b)
Indol-3-ácido Propiônico	IPA	31,27	20,40
Indol-3-Acetamida	IAM	20,73	21,88
Indol-3 Ácido Butírico	IBA	33,96	24,86
Indol-3-Etanol ou Triptofol	TOL	27,26	28,48
Indol-3-Acetonitrila	IAN	34,82	30,00
Indol	IND	38,037	32,04

* Método 1, gradiente de acetonitrila:água ácida; Método 2, gradiente de metanol: tampão. IPyA – ver descrição no texto.

A separação de todos os compostos com o eluente A não foi possível, mesmo após serem testados diferentes gradientes de acetonitrila e água ácida (Figura 4). Os compostos AIA e TOL apresentaram nestas condições o tempo de retenção muito similares (~27,3 min) não sendo possível separá-los. Nestas condições, o IPyA apresentou dois picos com tempo de retenção de 26,43 (IPyA_b) e 30,95 minutos (IPyA_b). Os compostos IPyA_b e IPA que apresentaram um tempo de retenção de 30,95 e 31,27 minutos de retenção, respectivamente, não puderam ser separados nas condições testadas.

Nas análises com metanol e água em pH 7,0, os 12 compostos indólicos da mistura foram separados, apresentando picos isolados e únicos, com exceção do IPyA que apresentou dois picos com tempo de retenção de 18,56 (IPyA_a) e 27,39 minutos (IPyA_b) (Figura 4). Uma nova análise foi feita após dissolver o IPyA cristalizado diretamente na mistura com os 12 compostos indólicos, nas mesmas condições cromatográficas, para confirmar a identidade do pico com tempo de retenção de 27,39 minutos, sendo observado por esta análise um aumento na intensidade do pico IPyA_b. Uma solução fresca de IPyA e dos demais compostos foi preparada e

imediatamente analisada, porém o perfil cromatográfico desta nova mistura foi similar ao da mistura anterior (Figura 4).

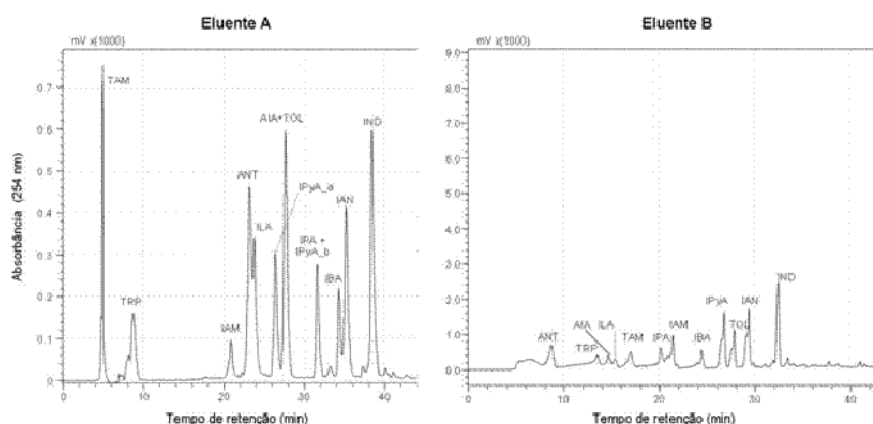


Figura 4: Perfil cromatográfico de 12 compostos indólicos analisados por HPLC com um gradiente de acetonitrila:água ácida (Método 1) e um gradiente de metanol:tampão fosfato (Método 2) como fase móvel. Para as abreviações verifique a tabela 1.

Como observado por Schwarz e Bitancourt (1960) a presença de dois picos de IPyA é uma evidência do equilíbrio entre as formas cetônica e enólica deste composto que é quebrado durante a cromatografia quando os dois tautômeros são separados. Além disso, o IPyA em solução aquosa pode ser decomposto em diferentes compostos, como será apresentado mais adiante. Apesar disto, o Método 2 foi estabelecido como o mais apropriado para as análises posteriores, já que nesta condição todos os doze padrões puderam ser separados.

A mistura destes padrões foi adicionada ao meio LGI-P e imediatamente submetida a extração com os cartuchos SPE-StrataX e SPE-C18, conforme detalhado no material e métodos. Após a extração e a análise com o Método 2 foi possível observar que o processo de extração tornou o pico de todos os compostos mais definidos permitindo, deste modo, uma análise qualitativa e quantitativa das amostras com o Método 2 (Figura 5).

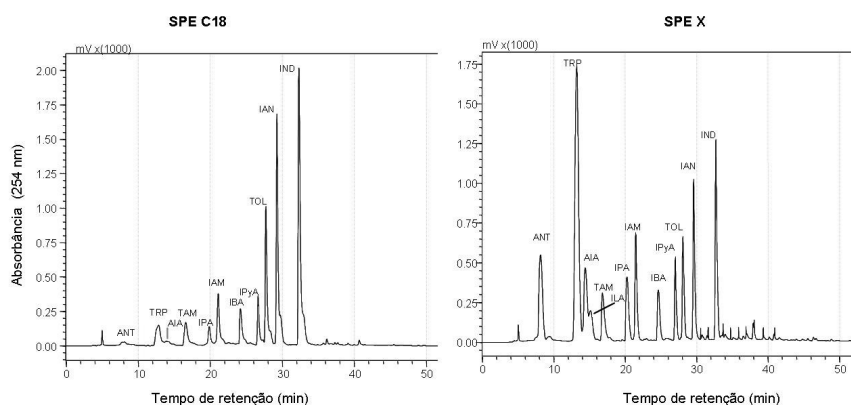


Figura 5: Perfil cromatográfico de doze compostos indólicos analisados por HPLC com gradiente de metanol:tampão como fase móvel, após extração com os cartuchos SPE-C18 (A) e SPE-StrataX (B).

A quantificação de cada composto permitiu observar que na amostra submetida à extração com o cartucho SPE-StrataX maior quantidade de compostos indólicos foi recuperada, com exceção dos compostos TOL, IAN e IND, que apresentaram maior quantidade na amostra extraída com o cartucho SPE-C18 (Figura 5, tabela 3). De um modo geral, o cartucho SPE-strataX recuperou maior quantidade de compostos indólicos (64%), que o SPE-C18 (39%) (Tabela 3).

Estes experimentos preliminares permitiram determinar as condições para extração e separação de auxinas do sobrenadante de *G. diazotrophicus*, sendo desta forma, estabelecidas para todas as análises a extração com o cartucho SPE-StrataX e a separação por HPLC utilizando como fase móvel um gradiente de metanol:água pH 7,0, como descrito na seção material e métodos.

As análises de HPLC da estirpe selvagem (PAL5^T) de *G. diazotrophicus* foram realizadas com 16 e 60 horas de crescimento na presença e ausência de L-triptofano. Foi observada uma expressiva alteração da coloração da cultura na presença do triptofano principalmente após 60 horas de cultivo (Figura 6). O perfil cromatográfico do sobrenadante da estirpe PAL5^T crescida em meio LGI-P na presença de triptofano é apresentado na Figura 7.

Tabela 3: Quantificação de doze compostos indólicos analisados por HPLC após extração com os cartuchos SPE-C18 e SPE-StrataX.

Quantidade recuperada	SPE-C18		SPE-StrataX	
	$\mu\text{g. ml}^{-1}$	% *	$\mu\text{g. ml}^{-1}$	%
Antranilato	1,9	9,4	22,1	110,3
L-Triptofano	7,8	6,5	45,9	38,2
Ácido-3-Indol Acético	2,5	12,7	22,5	112,5
Indol-3-Ácido Láctico	13,3	66,7	15,3	76,4
Triptamina	7,1	35,5	11,0	55,0
Indol-3-Ácido Propiônico	5,0	24,9	14,8	74,0
Indol-3-Acetamida	13,0	64,8	19,4	97,1
Indol-3 Ácido Butírico	15,2	75,9	15,0	75,0
Indo-3-Ácido Pirúvico	7,7	38,3	11,1	55,6
Indol-3-Etanol ou Triptofol	23,8	118,9	16,6	83,0
Indol-3-Acetonitrila	18,9	94,6	13,8	68,8
Indol	17,4	86,9	9,7	48,6
Total obtido	133,5	39,3	217,1	63,9

* Os compostos foram analisados por HPLC com um gradiente de metanol:tampão (Método 2), conforme descrito no material e métodos. *A porcentagem (%) foi calculada em relação à quantidade inicial de $20 \mu\text{g. ml}^{-1}$ de cada composto, ou $120 \mu\text{g. ml}^{-1}$ no caso do triptofano, e um total de compostos indólicos de $340 \mu\text{g. ml}^{-1}$.

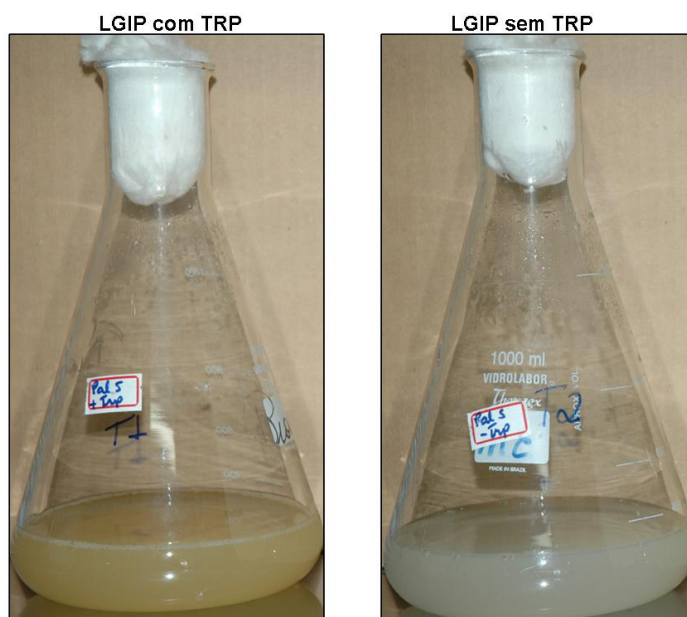


Figura 6: Cultura de *G. diazotrophicus* após 60 horas de cultivo na presença e ausência de L-triptofano sob agitação (200 rpm) e 30°C .

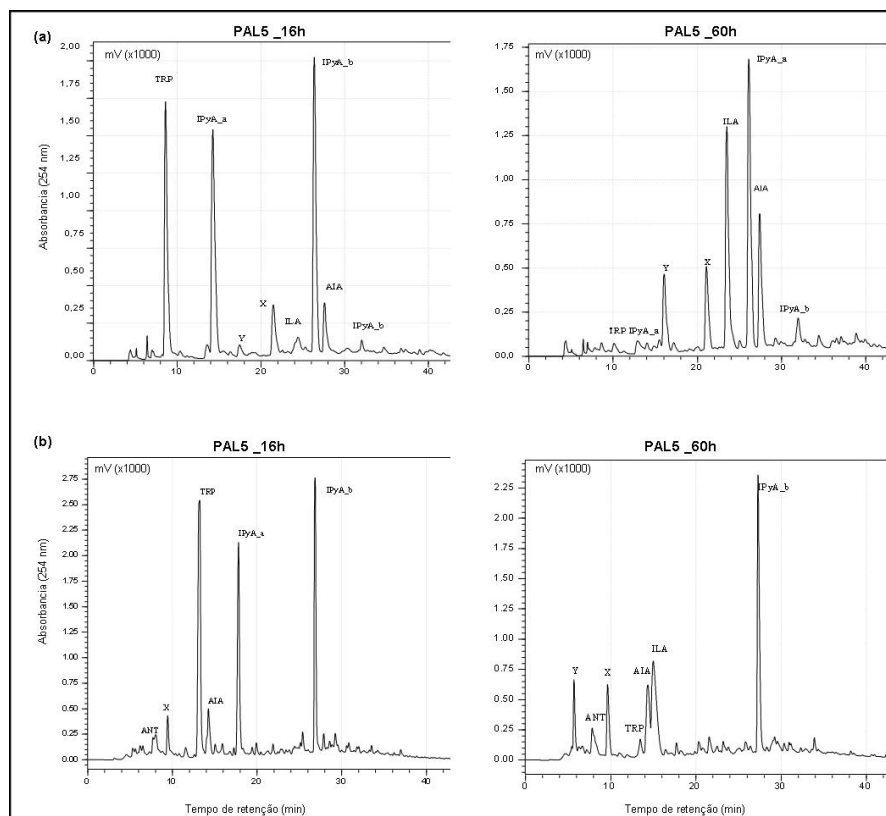


Figura 7: Perfil cromatográfico do sobrenadante da estirpe PAL5^T após 16 e 60 horas de crescimento em meio LGI-P na presença de L-triptofano analisados por HPLC com (a) gradiente de acetonitrila:água ácida (eluyente A) ou com (b) gradiente de metanol:tampão (eluyente B) como fase móvel, após extração com o cartucho SPE-StrataX, conforme descrito na seção material e métodos. Para as abreviações verifique a tabela 1.

Pelo menos três compostos indólicos principais foram detectados no sobrenadante da estirpe PAL5^T: o ILA, o IPyA e o AIA. O ILA apresentou um tempo de retenção de 14,43 minutos nas análises com Método 2 e foi detectado principalmente nas amostras obtidas após 60 horas de crescimento (Figura 7). O AIA foi identificado nas amostras de 16 e 60 h de crescimento, mas apresentou maior quantidade nas amostras com 60 h de cultivo. O IPyA, apresentou dois picos nas análises de 16 h com o Método 2, os quais foram identificados como IPyA_a (18,56 min) e IPyA_b (27, 39 min), sendo que somente o IPyA_b permaneceu nas análises feitas com 60 h. A confirmação da identidade deste composto pela análise com o Método 1, evidenciou a presença de dois picos com o mesmo tempo de retenção do IPyA (26,43 e 30,95 min) e adicionalmente um pico com tempo de retenção de aproximadamente 14 minutos. Este pico esteve presente somente nas análises feitas com 16 h. O mesmo foi observado para o pico do IPyA_a na análise com o Método 2. Assim, pode-se sugerir que este composto identificado com Método 1 corresponde ao IPyA_a nas

análises com o eluente B. Adicionalmente dois compostos (picos X e Y) foram detectados com Método 2 e também como o eluente A. Estes compostos não representam nenhum dos compostos indólicos utilizados como padrões e permanecem ainda não identificados.

A detecção do IPyA e o produto de sua redução (ILA) no sobrenadante de PAL5^T confirmam que *G. diazotrophicus* utiliza a rota de biossíntese de AIA via IPyA. A ocorrência da rota do IPyA em *G. diazotrophicus* foi sugerida por Fuentes-Ramírez et al. (1993) e Lee et al. (2004), após a detecção dos compostos indólicos ILA, IAAId, TOL e AIA no sobrenadante desta bactéria, embora o IPyA não tenha sido detectado nestes estudos. Portanto, os resultados obtidos mostram que a principal rota de biossíntese de AIA em *G. diazotrophicus* é a via do IPyA já que os intermediários de outras rotas de biossíntese conhecidas (TAM, IAM e IAN) não foram identificados em nenhuma das análises realizadas.

A biossíntese de AIA em *G. diazotrophicus* mostrou ser dependente da presença do triptofano no meio de cultura. O perfil cromatográfico de amostras obtidas após 60 horas de crescimento da estirpe PAL5^T na ausência de triptofano é muito similar ao perfil apresentado pelo meio de cultura LGI-P não inoculado, caracterizado pela ausência de picos (Figura 8).

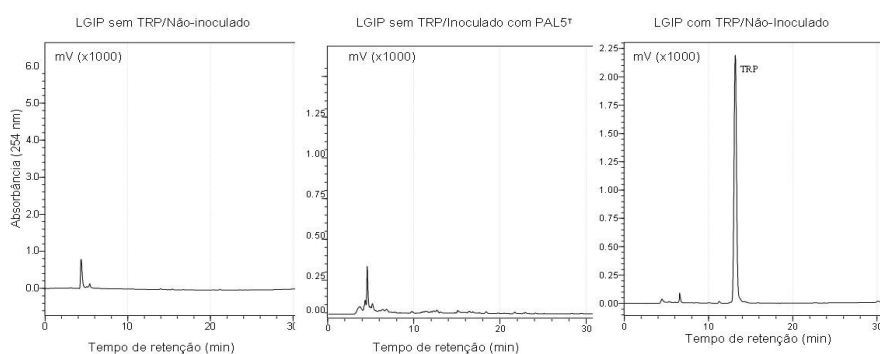


Figura 8: Perfil cromatográfico do sobrenadante da estirpe PAL5^T na ausência de triptofano, e do meio de cultivo LGI-P (com e sem triptofano) analisados por HPLC com um gradiente de metanol: tampão (Método 2) como fase móvel, após extração com o cartucho SPE-StrataX, conforme descrito na seção material e métodos. Para as abreviações verifique a tabela 1.

Os resultados destas análises de HPLC são semelhantes aos resultados anteriormente reportados por Lee e colaboradores (2004), que detectaram os compostos indol-3-ácido carboxílico (ICA), ILA, TOL e AIA no sobrenadante de *G. diazotrophicus* após 4 dias de crescimento em meio LGI-P com 100 µg. ml⁻¹ de triptofano.

A quantificação por HPLC de auxinas produzidas pela estirpe de *G. diazotrophicus* está apresentada na tabela 4. No sobrenadante da estirpe PAL5^T foi encontrado cerca de 3 µg.ml⁻¹ de triptofano no meio de cultura após 60 horas de crescimento, o que mostra que este aminoácido foi metabolizado por esta bactéria para a produção de auxinas (Tabela 9). A quantidade de AIA detectada no sobrenadante de PAL5^T foi 6 µg.ml⁻¹ e 13 µg.ml⁻¹ nas amostras de 16 e 60 horas de crescimento, respectivamente. Quantidades semelhantes foram reportadas por Lee e colaboradores (2004) que observaram entre 5 a 7 µg.ml⁻¹ de AIA no sobrenadante de *G. diazotrophicus* após 4 dias de crescimento em condições similares as utilizadas em nossos ensaios. A quantidade total de auxinas no sobrenadante da estirpe PAL5 após 60 horas de crescimento foi 120 µg.ml⁻¹ pela quantificação por HPLC sendo 54% representado pelo IPyA_b (Tabela 4).

A metodologia de extração utilizada no presente estudo foi eficiente na recuperação de compostos indólicos e, como seu procedimento requer pouca manipulação das amostras, isto pode ter contribuído para elevada quantidade de auxinas detectadas. Muitos destes compostos podem ser degradados durante a manipulação, em especial o IPyA que, por ser um composto muito instável, não tem sido detectado em estudos anteriores com *G. diazotrophicus* (FUENTES-RAMÍREZ et al., 1993; LEE et al., 2004).

Tabela 4: Análise quantitativa por HPLC de auxinas produzidas pela estirpe selvagem de *G. diazotrophicus* após 16 e 60 horas de crescimento em meio de cultivo LGI-P com triptofano.

Amostras	Estirpes	ANT	TRP	IAA	ILA	IPyA_a	IPyA_b	Total ^a
16 horas	PAL5 ^T	4,0	24,9	5,7	nd	38,5	36,6	84,8
60 horas	PAL5 ^T	6,4	3,4	13,1	35,8	nd	65,4	120,7

* Calculada pela equação de regressão linear de uma curva de calibração com os respectivos compostos indólicos analisados por HPLC. ^a O valor total foi obtido pela soma da quantidade dos compostos detectados, exceto o TRP. nd, não detectado.

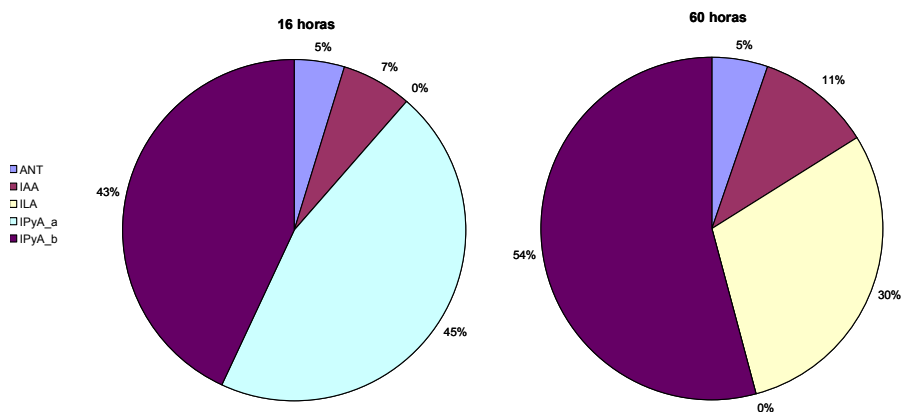


Figura 9: Análise quantitativa por HPLC de auxinas produzidas pela estirpe selvagem de *G. diazotrophicus* após 16 e 60 horas de crescimento em meio de cultivo LGI-P com triptofano. Contribuição de cada composto em porcentagem para o total de compostos (conforme tabela 4).

Conclusões

- O cartucho SPE Strata-X (Phenomenex) foi o mais eficiente na extração de compostos indólicos da solução aquosa (meio LGI-P)
- O Método gradiente de metanol:tampão fosfato pH 7,0 foi o mais apropriado na separação dos compostos indólicos
- A presença de IPyA no sobrenadante de *G. diazotrophicus* sugere que a rota do IPyA foi utilizada na biossíntese de AIA condições testadas.
- A biossíntese de AIA em *G. diazotrophicus* foi dependente da adição de L-triptofano já que na ausência deste, o perfil cromatográfico não apresentou picos evidentes.

Referências Bibliográficas

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 77, n. 3, p. 549-579, 2005.

BASHAN, Y.; LEVANONY, H. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 36, p. 591-608, 1990.

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

COSTACURTA, A.; VANDERLEYDEN J. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. **Critical Review in Microbiology**, London, v. 21, p.1–18, 1995.

DOBELLAERE, S.; CROONENBORGH, A.; TRYS, A.; VANDE BROEK, A.; VANDERLEYDEN, J. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. **Plant and Soil**, The Hague, v.212, p.155-164, 1999.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas em plantas não leguminosas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1995, 60 p.

FUENTES-RAMÍREZ, 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**, The Hague, v. 154, p. 145-150, 1993.

GILLIS, M.; KERSTERS, K.; HOSTE, B.; JANSSENS, D.; 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 Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington, DC, v.39, p. 361–364, 1989.

GLICKMANN, E.; DESSAUX, Y. A Critical Examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 61, p. 793–796, 1995.

GORDON, S. A.; WEBER, R. P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 26, p. 192–195, 1951.

LEE, S.; FLORES-ENCARNACIÓN, M.; CONTRERAS-ZENTELLA, M.; GARCIA-FLORES, L.; ESCAMILLA, J. E.; KENNEDY, C. Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *G. diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome C biogenesis genes. **Journal of bacteriology**, Washington, DC, v. 186, n. 16, p. 5384-5391, 2004.

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.

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

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, p. 609–615, 1991.

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.

SCHWARZ, K; BITANCOURT, A. A. Further Evidence of Tautomerism in Chromatograms of Indolyl-3-Pyruvic Acid. **Biochemical Journal**, London, v. 75, p. 182, 1960.

SEVILLA, M. BURRIS, R. H.; GUNAPALA, N. KENNEDY, K. C. Comparison of benefit to sugarcane plant growth and ¹⁵N₂ incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and Nif⁻ mutant strains. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 14, n. 3, p. 358-366, 2001.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Review**, Haren, v. 31, p. 425–448, 2007.

WOODWARD, A. W.; BARTEL, B. Auxin: regulation, action, and interaction. **Annals of Botany**, London, v. 95, p. 707-735, 2005.

YAMADA Y.; HOSHINO K.; ISHIKAWA T. *Gluconacetobacter* nom. corrig. (*Gluconoacetobacter* [sci]). In validation of publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB, List no. 64. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington, DC, v. 48, p. 327-328, 1998.

Embrapa

Agrobiologia

**Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento**

