

Bactérias promotoras de crescimento vegetal em *Vriesea gigantea* Gaudchi. (Bromeliaceae)

Adriana Ambrosini¹, Adriana Giongo², Anelise Beneduzi², Natália Cobalchini¹,
Lars Friedrich³ e Luciane Maria Pereira Passaglia⁴

Introdução

A família Bromeliaceae está dividida em três subfamílias: Pitcarnioideae, Bromelioideae e Tillandsioideae, possuindo aproximadamente 2750 espécies conhecidas [2] e apresentando seu maior centro de diversidade genética ao leste do Brasil, principalmente na Mata Atlântica [8]. As bromélias constituem um grupo diversificado de plantas com hábitos rupestres, terrestres ou epífitos. *Vriesea gigantea* Gaudchi., (1846) (Tillandsioideae), assim como tantas outras bromeliáceas, tem um alto potencial ornamental e faz parte da lista de espécies ameaçadas de extinção no Estado do Rio Grande do Sul [10]. Esta planta pode ser terrestre ou epífita [11] e está distribuída desde o Espírito Santo até o Rio Grande do Sul [8,11].

Plantas epífitas são interessantes por apresentarem tricomas de absorção foliar para captação e absorção de água e nutrientes, pois as raízes, quando presentes, atuam principalmente como uma estrutura de adesão ao hospedeiro. *V. gigantea* também possui um tanque de captação de água que contribui para o fornecimento de energia, uma vez que a água favorece a decomposição da matéria orgânica ali depositada (folhas, flores, sementes, pequenos animais, etc). Além disso, diversas substâncias essenciais ao desenvolvimento podem ser disponibilizadas por determinados microrganismos presentes no tanque e na superfície foliar [5]. A microflora filosférica é um importante objeto de pesquisa devido a sua potencial capacidade de colaborar beneficentemente para muitos aspectos essenciais do desenvolvimento vegetal [5,9]. Bactérias que em associação com as plantas exercem efeitos benéficos são genericamente chamadas PGPBs (Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal). Estudos com a bromélia *Tillandsia* (Tillandsioideae) mostraram que bactérias fixadoras de nitrogênio podem estar presentes e atuar como um coadjuvante no fornecimento de nutrientes [3].

Este trabalho teve o objetivo de isolar e caracterizar bactérias capazes de contribuir para o crescimento de *V. gigantea* através da fixação biológica do nitrogênio

atmosférico e da produção de sideróforos e fitohormônios. Tais processos estão relacionados, respectivamente, à formação de compostos nitrogenados assimiláveis, captação de ferro e produção de hormônios como o ácido indol-acético (AIA), substâncias essenciais ao desenvolvimento vegetal.

Material e métodos

A. Amostragem e Isolamento bacteriano

Dois exemplares de *V. gigantea* cultivadas na casa de vegetação do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) foram utilizados como plantas piloto para o isolamento de bactérias promotoras de crescimento vegetal. Folhas e tanque foram os dois tipos de microhabitats analisados. As folhas foram colocadas em solução fisiológica (NaCl 0,85%) por 2 horas sob agitação constante e após foram realizadas diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-4}). A água presente nos tanques foi coletada com a ajuda de uma seringa estéril e foi igualmente diluída conforme as proporções citadas acima.

As diluições foram inoculadas nos meios enriquecidos Timina Biotina (TB) e *Nitrogen Fixation* (NFb) [4], ambos sem nitrogênio. NFb, seletivo para bactérias fixadoras de nitrogênio Gram negativas (como *Azospirillum*) e TB, seletivo para bacilos fixadores de nitrogênio, foram utilizados para a caracterização dos isolados. Após incubação por 48h à 28°C, as bactérias isoladas foram purificadas através de re-inoculações e armazenadas para posteriores estudos.

B. Produção de Sideróforos e AIA

Os isolados foram inoculados em meio King B [3,4], contendo ou não triptofano, para a quantificação de ácido indol-acético (AIA). A mensuração da produção de AIA foi analisada em diferentes períodos de tempo, por 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 horas. As leituras foram realizadas com o reagente de Salkowski em espectrofotômetro a 530 nm. O meio King B, contendo o corante cromoazurol-S [1,6] e baixa quantidade de ferro, também foi utilizado para a verificação da produção de sideróforos através da formação de halos ao redor das colônias.

1. Bolsista de Iniciação Científica do Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, 9500, prédio 43312, sala 206, Porto Alegre, RS, CEP 91501-970. E-mail: adri_ambrosini@yahoo.com.br.

2. Bolsista de Doutorado do Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, 9500, prédio 43312, sala 206, Porto Alegre, RS, CEP 91501-970.

3. Estagiário Voluntário Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, 9500, prédio 43312, sala 206, Porto Alegre, RS, CEP 91501-970.

4. Professora Adjunto do Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, 9500, prédio 43312, sala 207, Porto Alegre, RS, CEP 91501-970. E-mail: lpassaglia@terra.com.br

Apoio financeiro: CAPES, CNPq e Fapergs.

Resultados

Foi possível identificar 24 isolados bacterianos diferentes oriundos de ambos os microhabitats analisados (folhas e tanque) em *V. gigantea*. A caracterização pelo teste de Gram exibiu um percentual de 31% de bactérias Gram negativas e 69% de Gram positivas. Oito tipos bacterianos foram isoladas em meio NFb (dois provenientes das folhas e seis do tanque) e dezesseis em meio TB (seis provenientes das folhas e dez do tanque).

Dos 24 isolados obtidos, 87% foi capaz de formar halos ao redor das colônias quando inoculados em meio King B contendo o corante cromoazurol-S. Todos os isolados foram capazes de produzir AIA em meio King B. As concentrações medidas tiveram variação de 200mg/ml a 800mg/ml sem a adição de triptofano, e de até 1500mg de AIA/ml na presença de triptofano.

Discussão

A predominância de bacilos na filosfera e no tanque dessas bromélias pode ser devido à capacidade de esporulação desses microrganismos (característica importante para a sobrevivência em ambientes limitantes), à capacidade de fixação de nitrogênio atmosférico (tornando-os auto-suficientes no que diz respeito ao aporte de nitrogênio) e à alta capacidade dos bacilos em degradar biopolímeros complexos [5]. Um maior número de bactérias foi encontrado no tanque em relação às folhas. Por serem normalmente habitantes de solo ou água, essas bactérias podem não estar totalmente adaptadas ao ambiente filofítico [3].

A formação do halo ao redor das colônias, no teste de verificação da produção de sideróforos, indica que o ferro ligado ao corante foi quelado por essa molécula. O sideróforo é utilizado por determinados organismos em situações de baixa disponibilidade de ferro no ambiente, pois é capaz de quelar e captar Fe^{3+} (íon férrico), transportando o complexo ferro-sideróforo para dentro da célula [1,13]. Microrganismos capazes de utilizar esse sistema são, possivelmente, mais competitivos e eficientes quanto à fixação biológica de nitrogênio [6,13]. Estima-se assim, que as bactérias que possuem a capacidade de produzir sideróforos, são muito interessantes para estudos posteriores sobre a possível disponibilização de ferro quelado para a planta.

A produção mais significativa de AIA entre os isolados inoculados em meio King B suplementado com triptofano, ocorreu porque o triptofano é um precursor desse tipo de auxina. A habilidade para sintetizar fitohormônios é amplamente distribuída entre bactérias associadas a plantas [5,14]. Muitas bactérias promotoras do crescimento sintetizam AIA, e seu efeito na planta mimetiza a do AIA endógeno [5]. A produção de AIA aparentemente não funciona como um hormônio em células bacterianas e pode ter evoluído devido a sua importância na relação bactéria-planta [5,7].

Para as plantas epifitas, especialmente as tropicais, a literatura indica as chuvas como uma fonte de vários nutrientes, pois a água atua como um veículo para a aquisição de sais inorgânicos e moléculas orgânicas, incluindo compostos nitrogenados [12]. A atividade das bactérias promotoras de crescimento vegetal presente na

folha pode contribuir substancialmente para o suporte de nitrogênio da planta. Além disso, esses microrganismos também contribuem para a nutrição de outros microrganismos filofíticos (leveduras, fungos) que constituem uma porção considerável da matéria orgânica [3,5].

Estudos posteriores serão realizados com os 24 isolados bacterianos visando à melhor caracterização desses microrganismos, inclusive ao nível de espécie. Procedimentos de biologia molecular serão utilizados para a caracterização genotípica do gene *nifH* (relacionado à capacidade de fixação biológica do nitrogênio), através da técnica de amplificação em cadeia (PCR). *Primers* específicos serão usados para amplificação e sequenciamento de uma porção do gene 16S ribossomal, visando à identificação das espécies bacterianas amostradas. Além disso, novos isolados deverão ser obtidos a partir de outra bromeliácea, *Tillandsia*, para comparação da população de PGPBs com *V. gigantea*.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Clarisse Palma, Gecele Paggi e Fernanda Bered.

Referências

- [1] BAGG, A. e NEILANDS, J.B. 1987. Molecular Mechanism of Regulation of Siderophore-Mediated Iron Assimilation. *Microbiological Reviews*, 51: 509-518.
- [2] BENZING, D.H. 2000. *Bromeliaceae: Profile of an adaptive radiation*. Cambridge, Cambridge University Press. 689 p.
- [3] BRIGHIGNA, L., MONTAINI, P., FAVILLI, F. e TREJO, A.C. 1992. Role of the nitrogen-fixing bacterial microflora in the epiphytism of *Tillandsia* (Bromeliaceae). *American Journal of Botany*, 79: 723-727.
- [4] DOBEREINER, J., BALDANI, V.L.D. e BALDANI, J.I. 1995. *Como identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas*. Itaguaí, EMBRAPA-CNPAB. 60 p.
- [5] LINDOW, S.E. e BRANDL, M.T. 2003. Microbiology of the Phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 1875-1883.
- [6] NEILANDS, J.B. 1995. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *The Journal of Biological Chemistry*, 270: 26723-26726.
- [7] PATTEN, C.L. e GLICK, B.R. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 3795-3801.
- [8] REITZ, R. 1983 *Bromeliáceas e a malária - bromélia endêmica*. *Flora Ilustrada Catarinense*. Itajaí, Herbário Barbosa Rodrigues, 808 p.
- [9] RUINEN, J. 1961. The phyllosphere: an ecological neglected milieu. *Plant and Soil*, 15: 81-109.
- [10] SEMA. 2006. Secretaria Estadual do Meio Ambiente [Online]. *Flora - Lista das Espécies Ameaçadas de Extinção no Rio Grande do Sul* Homepage: <http://www.sema.rs.gov.br/sema/html/pdf/especies-ameaçadas.pdf>
- [11] SMITH, L.B. e DOWS, R.J. 1977. Bromeliaceae (Tillandsioideae). *Flora Neotropica*, 14: 663-1492.
- [12] TUKEY, H.B. 1968. The leaching of substances from plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 21: 305-324.
- [13] WINKELMANN, G. 2002. Microbial siderophore-mediated transport. 30: *Biochemical Society Transactions*, 691-696
- [14] ZAKHAROVA, E.A., SHCHERBAKOV, A.A., BRUDNIK, V.V., SKRIPKO, N.G., BULKHIN, N.S. e IGNATOV, V.V. 1999. Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*: insights from quantum chemistry. *European Journal of Biochemistry*, 259: 572-576.