

## RIZOBACTÉRIAS PRODUTORAS DE PROMOTORES DO CRESCIMENTO DE PLANTAS<sup>1</sup>

Daniel Diego Costa Carvalho<sup>2</sup>, Denilson Ferreira Oliveira<sup>3</sup>, Moacir Pasqual<sup>4</sup>, Vicente Paulo Campos<sup>2</sup>

### ABSTRACT

PLANT GROWTH PROMOTER  
PRODUCING RHIZOBACTERIA

In order to select microorganisms able to produce plant growth promoters, previously isolated rhizobacteria were grown in a liquid medium. After cell removal by centrifugation, the liquid phases were freeze-dried and extracted with ethyl acetate. Once concentrated under vacuum, the extracts were dissolved in 6 mL of a sucrose solution and submitted to an assay with wheat (*Triticum aestivum* L.) coleoptiles. Among the rhizobacteria used in this work, one strain of *Bacillus cereus* Frankland and Frankland and *Bacillus megaterium* of Bary, and two strains of *Bacillus pumillus* Meyer and Gottheil promoted coleoptile growth.

KEY-WORDS: *Bacillus*; *Triticum aestivum*; tissue culture.

### RESUMO

Com vistas a selecionar microorganismos produtores de promotores do crescimento de plantas, rizobactérias, previamente isoladas e identificadas, foram cultivadas, em meio líquido de cultura. Após remoção das células, por centrifugação, as fases líquidas foram liofilizadas e extraídas com acetato de etila. Os extratos foram concentrados sob vácuo e solubilizados em 6 mL de solução de sacarose, para serem submetidos a testes com coleóptilos de trigo (*Triticum aestivum* L.). Dentre as rizobactérias estudadas, observou-se que uma estirpe de *Bacillus cereus* Frankland e Frankland e *Bacillus megaterium* de Bary, e duas estirpes de *Bacillus pumillus* Meyer e Gottheil foram capazes de promover o crescimento dos coleóptilos.

PALAVRAS-CHAVE: *Bacillus*; *Triticum aestivum*; cultura de tecidos.

### INTRODUÇÃO

As rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (Kloepper et al. 1989) podem atuar, indiretamente, pela supressão de doenças e, diretamente, pela produção ou alteração da concentração de fitormônios, fixação de nitrogênio, solubilização de fosfatos minerais ou outros nutrientes do solo, oxidação do enxofre, aumento da permeabilidade das raízes e produção de sideróforos (Mariano & Kloepper 2000). Para exemplificar, pode-se mencionar o *Azotobacter chroococum* Beijerinck, que acarreta aumento médio de 10%, na produção de 50% a 70% das lavouras de soja, nas quais tal microorganismo é aplicado (Mishustin & Naumova 1962, Mishustin 1963).

Quanto à produção de fitormônios, já se sabe que as rizobactérias são capazes de sintetizar substâncias como as giberelinas e ácido indolacético (AIA)

in vitro e na rizosfera de plantas (Freitas & Germida 1992), como é o caso de *Pseudomonas* spp. em raiz de milho (Pan et al. 1999). Sabe-se, também, que estas bactérias podem produzir citocininas (Buchenauer 1998). De forma análoga, rizobactérias dos gêneros *Bacillus* e *Serratia* têm sido incluídas entre as produtoras de fitormônios (Srinivasan et al. 1996, Buchenauer 1998).

Apesar de haver um número significativo de pesquisas sobre a utilização de rizobactérias na agricultura, há poucos trabalhos sobre o emprego dos metabólitos produzidos por esses microorganismos. Em decorrência, buscou-se, no presente estudo, selecionar rizobactérias capazes de produzir as referidas substâncias, a fim de serem empregadas no desenvolvimento de novas metodologias, para a promoção do crescimento de plantas agricultáveis, no campo ou na produção de mudas in vitro.

1. Trabalho recebido em maio/2008 e aceito para publicação em nov./2009 (nº registro: PAT 3947).

2. Universidade Federal de Lavras (Ufla), Departamento de Fitopatologia, Lavras, MG, Brasil.

E-mails: ufla-ddec@bol.com.br, vpcampos@ufla.br.

3. Universidade Federal de Lavras (Ufla), Departamento de Química, Lavras, MG, Brasil. E-mail: denilson@dqi.ufla.br.

4. Universidade Federal de Lavras (Ufla), Departamento de Agricultura, Lavras, MG, Brasil. E-mail: mpasqual@ufla.br.

## MATERIAL E MÉTODOS

As 20 estirpes rizobacterianas usadas neste trabalho foram, previamente, isoladas, por Coimbra (1998), de raízes de capim braquiária (*Brachiaria* sp.), pimentão (*Capsicum annuum* L.) cafeeiro (*Coffea arabica* L.), crotalária (*Crotalaria* sp.), quiabo (*Hibiscus esculentus* L.), mamona (*Ricinus communis* L.), tomateiro (*Solanum esculentum* Mill.), capuxinha (*Trapaecolum majus* L.) e milho (*Zea mays* L.). As estirpes bacterianas foram cultivadas em meio *tryptic soy agar* (TSA - Merck KgaA), durante dois dias, a 28°C, e transferidas para o meio líquido *tryptic soy broth* (TSB - Isofar Indústria e Comércio de Produtos Químicos). Após 10 dias, a 28°C, sob agitação constante (100 rpm), as células bacterianas foram removidas do meio, por centrifugação, a 10.000 g, por 15 minutos, e 3 mL dos sobrenadantes foram concentrados sob vácuo. Os resíduos obtidos foram agitados com 12 mL de acetato de etila (AcO-Et) e filtrados em algodão, dando origem a soluções que foram concentradas sob vácuo, gerando novos resíduos. Estes foram dissolvidos em 6 mL de solução aquosa de sacarose, a 2% (g mL<sup>-1</sup>), tamponada a pH 5,0 com K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1,794 g mL<sup>-1</sup>) e ácido cítrico mono-hidratado (1,019 g mL<sup>-1</sup>) (Nitsch & Nitsch 1996), para serem empregados nos testes.

Sementes de trigo (*Triticum aestivum* L.), da variedade BRS-49, foram semeadas em areia autoclavada umedecida e, após 3 dias na ausência de luz, as plântulas estioladas tiveram os 2 mm apicais cortados e descartados, aproveitando-se, para o teste, os coleóptilos, que correspondiam aos 4 mm seguintes. Os coleóptilos foram distribuídos em tubos de ensaio, contendo 2 mL das soluções a serem avaliadas, provenientes das dissoluções das frações orgânicas, em solução de sacarose, a 2%. Empregaram-se três repetições, sendo que, em cada tubo, havia 5 coleóptilos. Como controle negativo, empregou-se TSB após liofilização, extração com AcOEt e dissolução em solução tamponada de sacarose. Como controle positivo, empregou-se o ácido (2,4-diclorofenoxi) acético (2,4-D), a 1,5 mg L<sup>-1</sup> (Carvalho et al. 2008). Os tubos foram mantidos no escuro, a 25 ± 2°C, em sala de crescimento vegetativo, por 20 horas. Em seguida, os coleóptilos foram retirados dos tubos e dispostos lado a lado, sobre superfície preta, para serem fotografados com câmera digital. As imagens obtidas foram ampliadas (3,28 vezes) e impressas, para que as medições dos coleóptilos fossem rea-

lizadas com uma régua. Uma vez fotografados, os coleóptilos foram liofilizados e pesados em balança analítica. Para a realização dos cálculos estatísticos, empregaram-se os valores médios de massa seca de coleóptilo por tubo, enquanto, para a variável comprimento, o valor medido para cada coleóptilo correspondeu a uma repetição. Todos os valores foram convertidos em percentagem, em relação às médias obtidas para TSB, para serem, separadamente, submetidos à análise de variância (Anava) e ao teste Scott-Knott (1974), a 5% de probabilidade, no programa Sisvar (Ferreira 2000).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre as 20 estirpes estudadas (Tabela 1), observou-se que apenas os metabólitos de *B. pumillus* (85-17 e 83-21) e *B. megaterium* (55-16) acarretaram aumento da massa do coleóptilo, em relação ao meio de cultura TSB. Entretanto, para esse parâmetro, nenhuma das estirpes mencionadas foi capaz de gerar valores superiores aos obtidos com 2,4-D, que é um promotor de crescimento usualmente empregado na cultura de tecidos vegetais. Quanto aos comprimentos dos coleóptilos (Tabela 1), verificou-se que os metabólitos produzidos, *B. cereus* (56-12), *B. pumillus* (84-31 e 83-21) e *B. megaterium* (55-16), acarretaram a obtenção de valores maiores que o obtido com TSB e com 2,4-D.

Para *B. megaterium*, o resultado obtido neste estudo está em conformidade com o trabalho descrito por Lopez-Bucio et al. (2007), os quais observaram este microorganismo promovendo o crescimento e o desenvolvimento de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Chakraborty et al. (2006) também verificaram que esta bactéria promove o crescimento de *Aspalathus linearis* (N. L. Burm.) R. Dahlgr.

Em relação a *B. megaterium*, Karadeniz et al. (2006) observaram que esta bactéria pode produzir ácido giberélico, AIA e zeatina, que, em concentrações adequadas, podem promover o crescimento de plantas. De forma análoga, sabe-se que *B. pumillus* é capaz de promover o crescimento de plantas (Zhang et al. 2001, Joo et al. 2004), o que talvez seja decorrente da sua capacidade de produzir giberelinas (Joo et al. 2005) e AIA (Kang et al. 2006).

Quanto a *B. cereus*, é conhecida a sua capacidade de produzir ácido giberélico, AIA, zeatina (Karadeniz et al. 2006) e giberelinas (Joo et al. 2005). Além disso, Tilak et al. (2006) confirmaram o envol-

Tabela 1. Comprimento e massa da matéria seca de coleótipos de trigo, expostos aos metabólitos produzidos por bactérias isoladas das rizosferas de plantas.

Planta	Rizobactéria	Comprimento <sup>1,2</sup>		Massa <sup>1,2</sup>
		%		
<i>Brachiaria</i> sp.	<i>Bacillus pumillus</i> (84-20)	91,8 c		92,7 c
<i>Brachiaria</i> sp.	<i>Kluyvera cryocrescens</i> (84-26)	93,5 c		92,9 c
<i>Brachiaria</i> sp.	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (84-23)	95,7 d		94,5 c
<i>Brachiaria</i> sp.	<i>Kluyvera cryocrescens</i> (84-24)	101,5 d		100,0 c
<i>Brachiaria</i> sp.	<i>Bacillus pumillus</i> (84-31)	118,4 f		101,9 c
<i>Capsicum annuum</i> L.	<i>Bacillus pumillus</i> (84-29)	74,8 a		72,5 a
<i>Capsicum annuum</i> L.	<i>Bacillus pumillus</i> (84-28)	75,7 a		67,9 a
<i>Capsicum annuum</i> L.	<i>Bacillus megaterium</i> (58-09)	83,9 b		63,6 a
<i>Capsicum annuum</i> L.	<i>Bacillus pumillus</i> (85-19)	95,8 d		93,5 c
<i>Coffea arabica</i> L.	<i>Bacillus pumillus</i> (55-28)	89,9 c		92,8 c
<i>Coffea arabica</i> L.	<i>Kluyvera cryocrescens</i> (56-02)	103,3 d		96,4 c
<i>Crotalaria</i> sp.	<i>Bacillus pumillus</i> (85-17)	98,6 d		108,3 d
<i>Hibiscus esculentus</i> L.	<i>Bacillus megaterium</i> (55-16)	126,3 g		116,2 d
<i>Ricinus communis</i> L.	<i>Bacillus cereus</i> (56-12)	117,8 f		91,8 c
<i>Solanum esculentum</i> Mill.	<i>Bacillus pumillus</i> (56-28)	88,0 c		96,9 c
<i>Solanum esculentum</i> Mill.	<i>Bacillus pumillus</i> (83-28)	91,9 c		78,9 b
<i>Solanum esculentum</i> Mill.	<i>Bacillus pumillus</i> (85-14)	93,2 c		86,6 b
<i>Solanum esculentum</i> Mill.	<i>Bacillus pumillus</i> (55-08)	96,7 d		99,4 c
<i>Trapaeolum majus</i> L.	<i>Bacillus pumillus</i> (55-26)	76,6 a		86,3 b
<i>Zea mays</i> L.	<i>Bacillus pumillus</i> (83-21)	123,4 g		112,7 d
	TSB <sup>3</sup>	100,0 d		100,0 c
	2, 4 - D <sup>4</sup>	109,3 e		130,5 e
	Coefficiente de Variação	9,12 %		8,55 %

<sup>1</sup> Valores seguidos pela mesma letra, em cada coluna, não diferem, estatisticamente, segundo o teste Scott-Knott (1974), a 5% de probabilidade; <sup>2</sup> Valores relativos ao tratamento com TSB; <sup>3</sup> Após liofilização e extração; <sup>4</sup> 1,5 mg L<sup>-1</sup>.

vimento de *B. cereus* na promoção do crescimento de *Cajanus cajan* (L.) Millsp., enquanto Bullied et al. (2002) verificaram que esta bactéria promove o crescimento de soja, tanto na presença quanto na ausência de *Rhizobium* sp.

## CONCLUSÃO

Em vista dos resultados apresentados, pode-se concluir que, quando cultivadas em meio TSB, as rizobactérias *B. cereus* (56-12), *B. pumillus* (83-21 e 84-31) e *B. megaterium* (55-16) produzem substâncias promotoras do crescimento de coleótipo de trigo. Logo, apresentam potencial para serem empregadas no desenvolvimento de novos produtos para a promoção do crescimento de plantas.

## AGRADECIMENTO

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), pela concessão de bolsa de iniciação científica.

## REFERÊNCIAS

- BUCHENAUER, H. Biological control of soilborne diseases by rhizobacteria. *Journal of Plant Disease and Protection*, Pflanzenschutz, v. 105, n. 4, p. 329-348, 1998.
- BULLIED, W. J.; BUSS, T. J.; VESSEY, J. K. *Bacillus cereus* UW85 inoculation effects on growth, nodulation, and N accumulation in grain legumes: field studies. *Canadian Journal of Plant Science*, Ottawa, v. 82, n. 2, p. 291-298, 2002.
- CARVALHO, D. D. C.; OLIVEIRA, D. F.; PASQUAL, M. Aperfeiçoamento do teste com coleótipo de trigo (*Triticum aestivum* L.) para a detecção de reguladores vegetais. *Plant Cell Culture & Micropropagation*, Lavras, v. 4, n. 1, p. 28-33, 2008.
- CHAKRABORTY, U.; CHAKRABORTY, B.; BASNET, M. Plant growth promotion and induction of resistance in *Camellia sinensis* by *Bacillus megaterium*. *Journal of Basic Microbiology*, Weinheim, v. 46, n. 3, p. 186-195, 2006.
- COIMBRA, J. L. *Rizobactérias antagonistas a Meloidogyne javanica, isolamento e parasitismo de fungos de fêmeas de*

- Meloidogyne spp.* 1998. 76 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)–Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1998.
- FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. *Anais...* São Carlos: Ufscar, 2000. p. 255-258.
- FREITAS, J. R.; GERMIDA, J. J. Growth promotion of winter wheat by fluorescent pseudomonads under growth chamber conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v. 24, n. 11, p. 1127-1135, 1992.
- JOO, G. J. et al. Gibberellins-producing rhizobacteria increase endogenous gibberellins content and promote growth of red peppers. *Journal of Microbiology*, Seoul, v. 43, n. 6, p. 510-515, dez. 2005.
- JOO, G. J. et al. Growth promotion of red pepper plug seedlings and the production of gibberellins by *Bacillus cereus*, *Bacillus macroides* and *Bacillus pumilus*. *Biotechnology Letters*, Dordrecht, v. 26, n. 6, p. 487-491, 2004.
- KANG, B. R. et al. Production of indole-3-acetic acid in the plant-beneficial strain *Pseudomonas chlororaphis* O6 is negatively regulated by the global sensor kinase GacS. *Current Microbiology*, New York, v. 52, n. 6, p. 473-476, 2006.
- KARADENIZ, A.; TOPCUOGLU, S. F.; INAN, S. Auxin, gibberellin, cytokinin and abscisic acid production in some bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, New York, v. 22, n. 10, p. 1061-1064, out. 2006.
- KLOEPPER, J. W.; LIFSHITZ, R.; ZABLOTOWICZ, R. M. Free-living bacteria inocula for enhancing crop productivity. *Trends in Biotechnology*, Amsterdam, v. 7, n. 1, p. 39-43, 1989.
- LOPEZ-BUCIO, J. et al. *Bacillus megaterium* rhizobacteria promote growth and alter root-system architecture through an auxin-and ethylene-independent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, Saint Paul, v. 20, n. 2, p. 207-217, 2007.
- MARIANO, R. L. R.; KLOEPPER, J. W. Método alternativo de biocontrole: resistência sistêmica induzida por rizobactérias. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, Passo Fundo, n. 8, p. 121-137, 2000.
- MISHUSTIN, E. N. Bacterial fertilizers and their effectiveness. *Mikrobiologiya*, Moscow, n. 32, p. 774-778, 1963.
- MISHUSTIN, E. N.; NAUMOVA, A. N. Bacterial fertilizers, and their effectiveness and mode of action. *Mikrobiologiya*, Moscow, n. 31, p. 543-555, 1962.
- NITSCH, J. P.; NITSCH, C. Studies on the growth of coleoptile and first internode sections: a new, sensitive, straight-growth test for auxins. *Plant Physiology*, Rockville, v. 31, n. 2, p. 94-111, 1996.
- PAN, B. et al. Plant-growth promoting rhizobacteria and kinetin as ways to promote corn growth and yield in a short-growing-season area. *European Journal of Agronomy*, Amsterdam, v. 11, n. 3-4, p. 179-186, 1999.
- SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. A cluster analyses method for grouping means in the analyses of variance. *Biometrics*, Oxford, v. 30, n. 3, p. 502-512, 1974.
- SRINIVASAN, M.; PETERSEN, D. J.; HOLL, F. B. Influence of indoleacetic-acid-producing *Bacillus* isolates on the nodulation of *Phaseolus vulgaris* by *Rhizobium etli* under gnotobiotic conditions. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 42, n. 10, p. 1006-1014, 1996.
- TILAK, K. V. B. R.; RANGANAYAKI, N.; MANOHARACHARI, C. Synergistic effects of plant-growth promoting rhizobacteria and *Rhizobium* on nodulation and nitrogen fixation by pigeonpea (*Cajanus cajan*). *European Journal of Soil Science*, Oxford, v. 57, n. 1, p. 67-71, 2006.
- ZHANG, S. et al. Lack of induced systemic resistance in peanut to late leaf spot disease by plant growth-promoting rhizobacteria and chemical elicitors. *Plant Disease*, Saint Paul, v. 85, n. 8, p. 879-884, 2001.