

**MAIONE WITTIG FRANCO**

**COLONIZAÇÃO DE *Brasilonema Octagenarum* UFV-E1  
(CYANOBACTERIA) SOBRE PLANTAS JOVENS DE  
EUCALIPTO E A IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS  
BIOATIVAS**

**Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Botânica, para obtenção do  
título de *Magister Scientiae*.**

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL,  
2010**

MAIONE WITTIG FRANCO

**COLONIZAÇÃO DE *Brasilonema octagenarum* UFV-E1  
(CYANOBACTERIA) SOBRE PLANTAS JOVENS DE  
EUCALIPTO E A IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS  
BIOATIVAS**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Botânica, para obtenção do título  
de *Magister Scientiae*.

**APROVADA: 29 de janeiro de 2010.**

---

**Pesq. Kacilda Naomi Kuki**  
(Co-orientadora)

---

**Prof<sup>ª</sup>. Marília Contin Ventrella**  
(Co-orientadora)

---

**Prof<sup>ª</sup>. Marli de Fátima Fiore**

---

**Prof<sup>º</sup>. Antônio Galvão do Nascimento**

---

**Prof<sup>ª</sup> Rosane Maria de Aguiar Euclides**  
(Orientadora)

Ao meu pai,  
Mussoline Franco,

Dedico.

*“A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios.  
Por isso, cante, chore, dance, ria e viva intensamente, antes  
que a cortina se feche e a peça termine sem aplausos.”*

Charles Chaplin

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização dos cursos de pós-graduação em Botânica, graduação em Ciências Biológicas, e ensino médio no Colégio Universitário.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

À Prof<sup>ra</sup> Rosane Aguiar, pela orientação, confiança, companheirismo, pelos ensinamentos e oportunidades importantíssimos na minha formação profissional, e pela amizade muito além do campo profissional.

À Pesquisadora Kacilda Naomi Kuki pela amizade, por todos os conselhos e contribuições imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Marco Antonio Oliva Cano, por todos os ensinamentos pelos auxílios, e pelo exemplo de pesquisador.

À Prof<sup>ra</sup> Marília Contin Ventrella, pelos ensinamentos e contribuições para a realização deste trabalho.

À Dr<sup>a</sup> Estela Stenico pelo apoio, e por responder prontamente às minhas dúvidas.

À Prof<sup>ra</sup> Marli de Fátima Fiore, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), da Universidade de São Paulo (USP), pela parceria na realização deste trabalho.

Ao Prof<sup>o</sup> Antônio Galvão do Nascimento, por todos os ensinamentos.

Ao Prof<sup>o</sup> Acelino Couto Alfenas, pelo apoio e incentivo na realização dos experimentos.

Ao Paulo E. A. Marinho, meu namorado, por me encorajar nas horas de dificuldade e pelo tempo tirado de nossa vida dedicado à concretização deste trabalho.

A todos os colegas da UCP, que me auxiliaram seja nos dias de muito trabalho ou simplesmente respondendo minhas dúvidas: Alberto, Priscila, Rinamara, Renan, Claudinéia, Michelle, Débora, Carol, Patrícia Luisa, Dudu. Ao Clenilson pela ajuda com as análises de dados. Ao Vinícius pela contribuição nos trabalhos de anatomia.

Aos funcionários do laboratório: Rogério Gomide e João Bosco, sempre dispostos a ajudar.

Aos funcionários do Viveiro Experimental, Alex Ferreira de Freitas e Sebastião José de Freitas, pelo apoio durante a condução dos experimentos.

Aos meus pais, Mussoline Franco e Zenilde Wolff Wittig, pelo apoio quando decidi estudar em Viçosa e por terem esperado, pacientemente, minhas tantas idas e vindas para casa.

Acima de tudo, agradeço a Deus por me guiar, dando boas oportunidades e me fazendo encontrar pessoas que tornam melhor o meu caminho.

**Muito Obrigada!**

# SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	ix
<b>ABSTRACT</b> .....	xi
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
<b>2. REFERÊNCIAS</b> .....	2
<b>CAPÍTULO I - Relação entre a colonização inicial de <i>Brasilonema octagenarum</i> UFV-E1 (Cyanobacteria) e plantas jovens de <i>Eucalyptus urograndis</i></b> .....	4
<b>RESUMO</b> .....	5
<b>ABSTRACT</b> .....	6
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	7
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	8
2.1. <i>Coleta dos biofilmes de cianobactéria</i> .....	8
2.2. <i>Enriquecimento das amostras e o isolamento de espécimens</i> .....	9
2.3. <i>Determinação da produção de biomassa</i> .....	9
2.4. <i>Experimento em condições semi-controladas</i> .....	9
2.4.1. <i>Material vegetal</i> .....	9
2.4.2. <i>Obtenção do inóculo</i> .....	10
2.4.3. <i>Inoculação</i> .....	10
2.4.4. <i>Variáveis avaliadas</i> .....	10
2.4.4.1. <i>Quantificação de colonização</i> .....	10
2.4.4.2. <i>Pigmentos</i> .....	11
2.4.4.3. <i>Compostos fenólicos totais</i> .....	11
2.4.4.4. <i>Parâmetros biométricos</i> .....	11
2.4.4.5. <i>Quantificação de nitrogênio</i> .....	11
2.5. <i>Análise estatística</i> .....	12
2.6. <i>Avaliação anatômica</i> .....	12
<b>3. RESULTADOS</b> .....	13
3.1. <i>Isolamento</i> .....	13
3.2. <i>Determinação da produção de biomassa</i> .....	14
3.3. <i>Experimento em condições semi-controladas</i> .....	14

3.3.1.	<i>Variáveis avaliadas</i> .....	14
3.3.1.1.	<i>Quantificação de colonização</i> .....	14
3.3.1.2.	<i>Pigmentos</i> .....	15
3.3.1.3.	<i>Compostos fenólicos totais</i> .....	15
3.3.1.4.	<i>Parâmetros biométricos</i> .....	16
3.3.1.5.	<i>Quantificação de nitrogênio</i> .....	17
3.4.	<i>Avaliação anatômica</i> .....	18
<b>4.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	21
<b>5.</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	24
<b>CAPÍTULO II - Identificação e atividade biológica de substâncias produzidas por <i>Brasilonema. octagenarum</i> UFV-E1 (Cyanobacteria) no enraizamento de mini-estacas de eucalipto</b> .....		
		28
<b>RESUMO</b> .....		29
<b>ABSTRACT</b> .....		30
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....		31
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....		33
2.1.	<i>Cultivo de <b>B. octagenarum</b></i> .....	33
2.2.	<i>Obtenção da solução contendo PEC</i> .....	33
2.3.	<i>Bioensaio - crescimento de radículas de alface expostas aos produtos extracelulares de <b>B. octagenarum</b></i> .....	33
2.4.	<i>Experimento com mini-estacas em condições semi-controladas</i> .....	34
2.4.1.	<i>Obtenção do inóculo</i> .....	34
2.4.2.	<i>Obtenção do material vegetal</i> .....	34
2.4.3.	<i>Inoculação</i> .....	35
2.4.4.	<i>Variáveis avaliadas</i> .....	35
2.4.4.1.	<i>Quantificação de colonização</i> .....	35
2.4.4.2.	<i>Conteúdo de pigmentos</i> .....	35
2.4.4.3.	<i>Parâmetros biométricos</i> .....	35
2.5.	<i>Análises estatísticas</i> .....	36
2.6.	<i>Identificação das substâncias bioativas</i> .....	36
<b>3. RESULTADOS</b> .....		37



<i>3.1. Avaliação do crescimento de radículas de alface</i> .....	37
<i>3.2. Experimento em condições semi-controladas</i> .....	38
<i>3.2.1. Conteúdo de pigmentos</i> .....	38
<i>3.2.2. Parâmetros biométricos</i> .....	39
<i>3.2.3. Quantificação de colonização</i> .....	43
<i>3.3. Identificação das substâncias bioativas</i> .....	43
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	45
<b>5. REFERÊNCIAS</b> .....	47
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	50

## RESUMO

FRANCO, Maione Wittig, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2010.

**Colonização de *Brasilonema octagenarum* UFV-E1 (Cyanobacteria) sobre plantas jovens de eucalipto e a identificação de substâncias bioativas.**

Orientador: Rosane Maria de Aguiar Euclides. Co-orientadores: Kacilda Naomi Kuki e Marília Contin Ventrella.

As cianobactérias produzem uma grande diversidade de compostos biológicos de interesse econômico-industrial, referidos genericamente como “substâncias bioativas”, uma expressão ampla que inclui substâncias capazes de, em baixas concentrações, afetar processos metabólicos vitais de outros organismos. Recentemente, uma nova espécie de cianobactéria, *Brasilonema octagenarum* UFV-E1 foi identificada, em viveiro de produção de mudas clonais, formando um biofilme denso sobre a parte aérea de plantas jovens de *Eucalyptus* spp. O objetivo deste trabalho foi investigar as conseqüências da colonização por *B. octagenarum* sobre plantas jovens de *Eucalyptus urograndis*, sendo analisados aspectos morfológicos, bioquímicos, e de crescimento. Os experimentos foram realizados sob condições de umidade e temperatura controladas. Suspensão celular de *B. octagenarum* foi aplicada sobre a parte aérea de plantas jovens e o controle consistiu de plantas não inoculadas. Decorridos trinta dias após a inoculação, observou-se a formação de colônias dispersas sobre o limbo foliar. Nas áreas colonizadas, houve diminuição na relação clorofila *a* / *b* em 19% em relação ao controle. Não houve diferença significativa no conteúdo dos pigmentos (clorofila *a*, *b* e carotenos). Dentre os parâmetros biométricos avaliados (massa seca de folhas, caule e raiz, área foliar e altura do caule) ficou evidente o aumento de massa seca de raiz e de caule em relação ao controle (19 e 23%, respectivamente). Não foram observadas alterações anatômicas, ou a produção de compostos fenólicos totais. *B. octagenarum* colonizou as folhas das plantas, numa relação de epifitismo, sem ocasionar efeitos prejudiciais, durante o período de avaliação deste estudo, em que foram observados os estágios iniciais da colonização. As plantas responderam positivamente à colonização, com maior produção de massa seca, principalmente de caule e de raiz. Diante deste estímulo no crescimento, semelhante ao tratamento com auxinas, investigou-se a produção de substâncias

bioativas por *B. octagenarum*, através de bioensaio e a influência da colonização por esta espécie de cianobactéria no enraizamento de mini-estacas de *E. urophylla* e *E. urograndis*. O extrato de células de *B. octagenarum* foi analisado em cromatógrafo líquido acoplado em espectrômetro de massa, LC-MS/MS. Mini-estacas de *E. urophylla* e *E. urograndis* foram inoculadas com suspensão celular de *B. octagenarum*. Houve aumento de massa seca de raízes, em 31% e de caule (44%) na espécie *E. urophylla*. Através da análise em LC-MS/MS, identificou-se o ácido indol acético (AIA), com 175 Da. A colonização por *B. octagenarum* em *Eucalyptus urograndis*, sob as condições adotadas neste estudo, estimulou o crescimento das plantas, possivelmente, em resposta à produção do AIA. Foi demonstrado que *B. octagenarum* produz a auxina ácido indol acético e que essa cianobactéria possui potencial para ser utilizada no desenvolvimento de técnicas de propagação vegetativa em culturas de eucalipto.

## ABSTRACT

FRANCO, Maione Wittig, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, January, 2010.

**Colonization of *Brasilonema octagenarum* UFV-E1 (Cyanobacteria) in young plants of eucalyptus and the identification of bioactive substances.** Advisor: Rosane Maria de Aguiar Euclides. Co-advisors: Kacilda Naomi Kuki and Marília Contin Ventrella.

Cyanobacteria produces a wide variety of biological compounds of economic-industrial interest, often referred to as “bioactive molecules”. This is a broad term that include substances, which at low concentrations, are able to affect vital metabolic processes. Recently, a new species of cyanobacteria, *Brasilonema octagenarum* UFV-E1, was identified. The cyanobacteria was found forming a dense biofilm covering the aerial parts of young plants of *Eucalyptus* spp on a clonal plant nursery. The aim of this study was to investigate the consequences of *B. octagenarum* colonization, on morphological, biochemical, and growth traits of young plants of *Eucalyptus urograndis*. The experiments were carried out under humidity and temperature controlled conditions. A cellular suspension of *B. octagenarum* was applied over the aerial parts of young plants. The control group consisted of non inoculated plants. Thirty days after the inoculation, the formation of scattered colonies over the leaf was observed. There was a decrease of 19% in the chlorophyll *a* / *b* ratio in the leaf areas beneath the colonies. There was no significant difference in the content of pigments (chlorophyll *a*, *b* and carotenoids). The plants responded positively to the colonization, with increase of dry mass production, mainly of the stem and root. The increase of the root and stem dry mass of colonized plants were significantly higher compared to the control group (19 and 23%, respectively). Neither anatomic alterations nor an increase in the production of total phenolic compounds were observed. During the duration period of the experiment, which compromised the initial stages of colonization, *B. octagenarum* colonized the aerial part of the plant without damaging it, establishing an epiphytism relation. The effects of bioactive compounds by *B. octagenarum*, as stimuli to plant growth, such auxin, was tested by means of a bioassay, and the influence of this cyanobacteria species colonization on rooting process of *E. urophylla* and *E.*

*urograndis* mini-cuttings was investigated. The extract of *B. octagenarum* cells was analyzed in liquid chromatography coupled to mass spectrometer, LC-MS/MS. Mini-cuttings of *E. urophylla* and *E. urograndis* were inoculated with a concentrated solution of *B. octagenarum* cells. There was a significant increase in dry mass in the roots (31%), and in the stem (44%) in the *E. urophylla*. Through the LC-MS/MS analyses, indol acetic acid (IAA) was identified, has 175 Da. The colonization of *B. octagenarum* in *Eucalyptus urograndis*, under the conditions of this study, stimulated the growth of plants, possibly in response to the IAA production. It was demonstrated that *B. octagenarum* produces the auxin indol acetic acid, and that this cyanobacteria has the potential to be used in developing techniques of vegetative propagation of eucalyptus plants.

## INTRODUÇÃO GERAL

As cianobactérias são procariontes com parede celular similar a das bactérias gram-negativas (Lee, 2008). Estes microrganismos constituem o único grupo de bactérias diazotróficas que, assim como as plantas vasculares, realizam a fotossíntese e liberam oxigênio como um dos produtos finais do processo (Berman-Frank et al., 2003). Possuem muitas estratégias de adaptação a condições ambientais adversas, tais como a adaptação cromática, a fixação biológica de nitrogênio (FBN<sub>2</sub>), a utilização de diferentes fontes de carbono, e a capacidade de armazenar nutrientes em inclusões citoplasmáticas (Lee, 2008).

Em técnicas de fertilização, em campos de arroz alagado, tradicionalmente, as cianobactérias são utilizadas por proporcionarem benefícios ao crescimento das plantas, tais como o enriquecimento do substrato através da fixação biológica do nitrogênio, o aumento da disponibilidade de fósforo e a produção de polissacarídeos extracelulares que auxiliam na formação de agregados (Vaishampayan et al., 2001). Além disso, o aumento da produtividade em plantações de arroz, em função da fertilização com cianobactérias, tem sido atribuído à presença de substâncias bioativas, tais como vitaminas e reguladores do crescimento vegetal, liberadas por estes microrganismos no meio (Roger & Kulasooriya 1980; Chauhan & Gupta, 1984; Roger et al., 1993).

Embora sejam capazes de viverem independentemente, várias espécies de cianobactérias formam associações simbióticas com outros organismos: diatomáceas, fungos, briófitas e plantas superiores dos gêneros *Azolla*, *Cycas* e *Gunnera* (Rai et al., 2000).

Muitas espécies de cianobactérias podem colonizar habitats aéreos ou subaerofíticos, formando biofilmes, ou mantos, que são caracterizados pela formação de placas densas e coesas aderidas ao substrato (Jorgensen et al., 1979). Os biofilmes podem ser encontrados também em ambientes aquáticos (Doemel & Brock, 1977), superfícies úmidas de solos, rochas (Hrouzek & Šoun, 2004) e até mesmo, sobre monumentos históricos (Albertano & Urzi, 1999).

Recentemente, a colonização por cianobactérias foi registrada em plantas vasculares, formando biofilmes sobre a área basal das folhas de bromélias de regiões tropicais e subtropicais (Fiore et al., 2007), ou desenvolvendo-se sobre as raízes de orquídeas cultivadas em casa de vegetação simulando condições de floresta tropical úmida (Tsavkelova et al., 2003).

Em um viveiro de produção de mudas clonais de *Eucalyptus sp.*, localizado no município de Timóteo (MG), um nova espécie de cianobactéria subaerofítica, *Brasilonema octagenarum* UFV-E1, foi descrita por Aguiar et al. (2008), sendo encontrada, como a espécie dominante, formando um biofilme denso sobre a parte aérea das plantas, principalmente naquelas que permaneciam por mais tempo no viveiro em condições de pleno sol e irrigação constante.

O presente trabalho foi desenvolvido em duas etapas. A primeira teve como objetivo estudar a relação inicial entre a cianobactéria *B. octagenarum* e as plantas de *Eucalyptus spp.*, em condições de viveiro. Foram investigadas as conseqüências da colonização para plantas de *Eucalyptus*, sob os aspectos morfológico, bioquímico e de crescimento. A segunda etapa teve por objetivo investigar a produção de substâncias bioativas por *B. octagenarum* e avaliar os efeitos da colonização por esta espécie de cianobactéria no enraizamento de mini-estacas de *Eucalyptus urophylla* e *E. urograndis*.

Espera-se que esta pesquisa contribua para o entendimento dos efeitos da colonização de cianobactérias sobre plantas vasculares e que este conhecimento possa implementar as técnicas de manejo atualmente aplicadas em mudas clonais de eucaliptos. Presume-se que as substâncias bioativas, sintetizadas pelas cianobactérias, possuam potencial para serem utilizadas em propagação vegetativa de espécies vegetais lenhosas de importância econômica.

## **REFERÊNCIAS:**

Aguiar R., Fiore M. F., Franco M. W., Ventrella M. C., Lorenzi A. S., Vanetti C. A. & Alfenas A. C. (2008) A novel epiphytic cyanobacterial species from the genus *Brasilonema* causing damage to *Eucalyptus* leaves. *J. Phycol.* 44, 1322–1334.

- Albertano P. & Urzi C. (1999) Structural interactions among epilithic cyanobacteria and heterotrophic microorganisms in Roman hypogea. *Microbiol. Ecology* 38, 244-252.
- Berman-Frank I., Lundgren P. & Falkowski P. (2003) Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. *Res. Microbiol.* 154, 157-164.
- Chauhan K. L. & Gupta A. B. (1984) Cytokinin-like substances in Blue-green algae. *Curr. Sci.* 53 (6), 234-235.
- Doemel W. N. & Brock T. D. (1977) Structure, growth, and decomposition of laminated algal-bacterial mats in alkaline hot springs. *Appl. Environ. Microbiol.*, 34 (4), 433-452.
- Fiore M. F., Sant'Anna C. L., Azevedo M. T. P., Komárek J., Kaštovský J. S., Lorenzi A. S. (2007) The cyanobacterial genus *Brasilonema*, gen. Nov., a molecular and phenotypic evaluation. *J. Phycol.* 43, 789-798.
- Hrouzek P. & Šoun, J. (2004) Some finds of subaerophytic cyanobacteria on wetted walls of La Palma (Canary Islands). *Czech Phycol.* 4, 155-162.
- Jorgensen B. B., Revsbech, N. P., Blackburn T. H. & Cohen Y. (1979) Diurnal cycle of oxygen and sulfide microgradients and microbial photosynthesis in a cyanobacterial mat sediment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 38, 46-58.
- Lee, R.E. (2008) *Phycology*. 3<sup>rd</sup> Ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- Rai A. N., Soderback E. & Bergman B. (2000) Cyanobacterium- plant symbioses. *New Phytol.* 147, 449-481.
- Roger P. A. & Kulasooriya S. A. (1980) *Blue-greenn alge and Rice*. The international Rice Institute. Manila.
- Roger P. A., Zimmerman W. J., Lumpkin T. A. (1993) Microbiological management of wetland rice fields. (Metting B. F., ed), pp 417-455. *Soil microbial ecology: applications in agricultural and environmental management*. Marcel Dekker, New York.
- Tsavkelova E. A., Lobakova E. S., Kolomeitseva G. L., Cherdyntseva T. A. & Netrusov A. I. (2003) Localization of associative cyanobacteria on the roots of epiphytic orchids. *Microbiology* 72 (1), 99-104.
- Vaishampayan A., Sinha R. P., Hader D. P. L., Dey T., Gupta A. K., Bhan., U & Rao A. L. (2001) Cyanobacterial biofertilizers in rice agriculture. *The Bot. Rev.*, 7 (4), 453-516.



## CAPÍTULO I

**Relação entre a colonização inicial de *Brasilonema octagenarum*  
UFV-E1 (Cyanobacteria) e plantas jovens de *Eucalyptus urograndis***

## **Relação entre a colonização inicial de *Brasilonema octagenarum* UFV-E1 (Cyanobacteria) e plantas jovens de *Eucalyptus urograndis***

---

### **Resumo**

*Brasilonema octagenarum*, uma cianobactéria recentemente descrita, foi encontrada em viveiro de produção de mudas clonais, sendo dominante em um biofilme denso sobre a parte aérea de plantas jovens de *Eucalyptus* spp. Neste estudo foram investigadas as conseqüências da colonização por *B. octagenarum* sobre plantas de *Eucalyptus urograndis*, sob os aspectos morfológico, bioquímico e de crescimento. Suspensão celular de *B. octagenarum* foi aplicada sobre a parte aérea de plantas jovens, mantidas em condições semi-controladas de umidade e temperatura. Plantas não inoculadas foram utilizadas como controle. Decorridos trinta dias, foram observadas a formação de colônias dispersas sobre o limbo foliar. Houve diminuição de 19% na razão clorofila *a/b*, em áreas colonizadas. Dentre os parâmetros biométricos avaliados (massa seca de folha, caule e raiz, área foliar e altura do caule) foi evidente o aumento de massa seca da raiz e do caule em relação ao controle (19 e 23%, respectivamente). Não foram observadas alterações anatômicas, ou aumento na produção de compostos fenólicos totais. *B. octagenarum* colonizou a parte aérea das plantas, numa relação de epifitismo, sem ocasionar danos, durante o período avaliado, quando foram observados os estágios iniciais da colonização. Este é o primeiro trabalho a demonstrar que uma cianobactéria, quando inoculada sobre a parte aérea de planta vascular é capaz de estimular o crescimento vegetal, possivelmente em resposta à produção de substâncias com efeitos similares aos dos fitormônios.

Palavras-chave: *Brasilonema octagenarum*, cianobactéria, colonização, *Eucalyptus*

---

## Effects of colonization by *Brasilonema octagenarum* UFV-E1 (Cyanobacteria) on young plants of *Eucalyptus urograndis*

---

### Abstract

*Brasilonema octagenarum*, a recently described cyanobacteria, was found in the nursery of clonal plants of *Eucalyptus* spp. It is the dominant species in the dense biofilm formed over the aerial part of such young plants. In this research, the consequences of the *B. octagenarum* colonization of *Eucalyptus urograndis* plants were investigated, under the morphological, biochemical, and growth aspects. A cellular suspension of *B. octagenarum* was applied on the aerial part of the young plants, kept in semi-controlled conditions of humidity and temperature. The control group consisted of non inoculated plants. Thirty days later, the cyanobacterial colonies scattered over the leaf was observed. There was a 19% decrease of *a/b* chlorophyll ratio, in the colonized areas. Among the evaluated growth parameters (leaf, stem and root dry mass, leaf area and stem height), the increase of the root and stem dry mass was evident (19 and 23%, respectively), in comparison to the control group. Neither anatomic alterations nor an increase in the production of total phenolic compounds were observed. During the period of the experiment, which compromised the initial stages of colonization, *B. octagenarum* colonized the aerial part of the plant without damaging it, establishing an epiphytism relation. This is the first study demonstrating that a cyanobacterium, when inoculated on aerial parts of vascular plants, is able to stimulate plant growth, probably as a response to compound productions with similar effects of phytohormones.

Key words: *Brasilonema octagenarum*, cyanobacteria, colonization, *Eucalyptus*

---

## 1. INTRODUÇÃO

As cianobactérias são procariontes com parede celular similar a de bactérias gram-negativas (Lee, 2008), como as plantas vasculares, realizam a fotossíntese e liberam oxigênio como um dos produtos finais desse processo (Berman-Frank et al., 2003).

Estes microrganismos podem colonizar diversos habitats, como solos, superfícies úmidas (Hrouzek & Soun, 2004), substratos rochosos e monumentos históricos (Albertano & Urzi, 1999; Macedo et al., 2009). A população de microrganismos presente em um substrato rochoso é, geralmente, o resultado de uma colonização sucessiva por diferentes grupos no decorrer de vários anos. É um processo que depende do substrato e das condições ambientais propiciarem a colonização (Macedo et al., 2009).

Em locais onde as condições de umidade e temperatura são mais favoráveis, as cianobactérias podem formar biofilmes sobre as plantas, em curtos períodos de tempo. Fiore et al., (2007) identificaram um novo gênero/espécie de cianobactéria (*Brasilonema bromeliae*) desenvolvendo-se sobre a superfície basal das folhas de bromélias em regiões de clima subtropical e tropical, no Brasil. Em casa de vegetação, simulando condições de uma floresta tropical úmida, Tsavkelova, et al., (2003) observaram a formação de densos biofilmes recobrando as raízes de orquídeas epífitas, nos quais foram identificados dez gêneros de cianobactérias filamentosas: *Nostoc*, *Fischerella*, *Oscillatoria*, *Lyngbya*, *Phormidium*, *Plectonema*, *Anabaena*, *Calothrix*, *Scytonema* e *Spirulina*, predominando o gênero *Nostoc*.

A capacidade das cianobactérias colonizarem a superfície de plantas também foi demonstrada sob condições de laboratório. Gantar et al., (1991), avaliaram o desenvolvimento de *Nostoc* sp., isolada a partir de amostras de solo, em associação com plântulas de trigo cultivadas em meio líquido. A cianobactéria foi observada colonizando a superfície das raízes, caules e folhas e penetrando nos espaços intercelulares da epiderme e do córtex.

Em viveiro de produção de mudas clonais de *Eucalyptus* spp., no município de Timóteo (MG), foi observada uma situação de colonização inédita. Uma nova espécie de cianobactéria, descrita por Aguiar et al., (2008), designada de *Brasilonema*

*octagenarum* UFV- E1, colonizando a parte aérea de plantas de *Eucalyptus* spp., incluindo caules, folhas e regiões meristemáticas. A nova espécie podia ser observada em pequenas colônias no jardim clonal e nas etapas subsequentes de produção de mudas: enraizamento das mini-estacas em casa de vegetação, aclimatação em casa de sombra e rustificação a pleno sol.

Entretanto, em plantas que permaneciam no viveiro sob as condições de pleno sol e aspersão frequentes, por períodos mais longos, a colonização resultava em um filme espesso, recobrendo toda a superfície foliar (adaxil e abaxial). Os danos causados às plantas eram visíveis, sendo observadas lesões, ou mesmo necroses nas folhas. Foi sugerido que as necroses resultavam do recobrimento do limbo, uma vez que o biofilme limitava a penetração de luz para realização da fotossíntese (Aguiar et al., 2008), deixando a planta vulnerável à infecção por fungos e bactérias, processo que era facilitado pela condição de elevada umidade.

Neste trabalho foi testada a hipótese de que a cianobactéria cresce sobre as plantas de *Eucalyptus urograndis* em uma relação de epifitismo. Para testar esta hipótese, o trabalho teve por objetivo estudar os efeitos da colonização por *B. octagenarum* na parte aérea das plantas jovens, em condições de casa de vegetação, durante um período de 30 dias, avaliando-se as alterações morfológicas, fisiológicas e de crescimento das plantas colonizadas.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### *2.1. Coleta dos biofilmes de cianobactéria*

Os biofilmes de cianobactérias foram coletados da superfície foliar de mudas clonais de *Eucalyptus urograndis*, em viveiro de produção de mudas, localizado no Município de Timóteo-MG, e transportados, em sacos plástico identificados, para o laboratório de Ficologia, do Departamento de Biologia Vegetal (DBV), da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

## 2.2. *Enriquecimento das amostras e o isolamento de espécimens*

Secções foliares de *Eucalyptus* (2 x 2 cm), contendo biofilmes de cianobactérias foram transferidas para placas de Petri enriquecidas com meio de cultura BG-11 líquido (Allen, 1973), suplementado ou não com fontes de nitrogênio (N) combinado (Kugrens et al., 2000). As placas foram acondicionadas em sala de cultivo, sendo incubadas sob condições fotoautotróficas (temperatura de  $25 \pm 2^\circ$  e fotoperíodo de 16/8 h de luz/escuro e irradiância média de  $115 \mu\text{mols f\acute{o}tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). Para o isolamento, foram utilizadas técnicas de micropipetagem e plaqueamento em meio de cultura líquido ou sólido (Aguiar, 2000).

## 2.3. *Determinação da produção de biomassa*

A determinação da produção de biomassa da cianobactéria isolada foi baseada no conteúdo de Clorofila *a* (Chl *a*). Utilizou-se metanol como solvente extrator, conforme descrito por Aguiar (2000). As determinações foram realizadas, em triplicatas, em intervalos de três dias. Após a extração, foi lida a absorbância em comprimento de onda igual a 665 nm. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de Chl *a*, no decorrer do tempo, segundo Meeks e Castenholz (1971).

## 2.4. *Experimento em condições semi-controladas*

### 2.4.1. *Material vegetal*

Plantas clonais de *Eucalyptus urograndis* (6304), com idade de sete meses, cultivadas em tubetes (30 x 125 mm) foram obtidas no viveiro experimental do Departamento de Engenharia Florestal (DEF), da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa- MG.

#### 2.4.2. *Obtenção do inóculo*

As culturas de *B. octagenarum* foram cultivadas em meio BG-11 líquido (Allen, 1973), não suplementado com N, em câmara de crescimento, sob condições fotoautotróficas e aeração constante. Para a obtenção do inóculo, 3 L de cultura com idade de 30 dias foram filtrados e concentrados em 10% do volume inicial, utilizando-se o mesmo meio em que a cultura foi obtida.

#### 2.4.3. *Inoculação*

As plantas foram transplantadas para vasos com capacidade de 2 L contendo substrato (MECPLANT) adubado na proporção de 8,33 g de substrato: 1 g de OSMOCOT (19-06-10): 2g de SUPERFOSFATO SIMPLES (00-18-00), e aclimatadas por duas semanas em casa de vegetação, com temperatura e umidade controladas. Foram aplicados 50 mL de suspensão de células como inóculo, de forma homogênea, sobre a parte aérea de cada planta, com auxílio de uma pipeta plástica.

Adotou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com seis repetições. O tratamento consistiu de plantas inoculadas e plantas não inoculadas, as quais foram utilizadas como controle.

O experimento foi conduzido por um período de trinta dias, a partir da data de inoculação.

#### 2.4.4. *Variáveis avaliadas*

##### 2.4.4.1. *Quantificação de colonização*

As colônias de cianobactérias foram removidas do limbo foliar e recolhidas para a quantificação, sendo o valor expresso como massa seca de cianobactérias por área foliar.

#### 2.4.4.2. *Pigmentos*

O conteúdo dos pigmentos: Clorofila *a* (Chl *a*), clorofila *b* (Chl *b*) e carotenóides foram determinados coletando-se 3 discos de folhas frescas de eucalipto ( $\varnothing = 0,59$  cm) e utilizando-se 7 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) para extração (Wellburn, 1994), no escuro, pelo período de 24h. A absorvância foi determinada nos  $\lambda$  de 665.1, 680 e 450 para Chl *a*, Chl *b* e carotenóides, respectivamente. Utilizou-se a porção mediana de folhas que terminaram o processo de amadurecimento, após a inoculação. Foram selecionadas para o estudo (coleta), apenas as áreas colonizadas por *B. octagenarum*.

#### 2.4.4.3. *Compostos fenólicos totais*

Os compostos fenólicos totais nas folhas foram avaliados, através da extração em metanol, de acordo com Salteveit (2004), utilizando-se discos de folhas frescas ( $\varnothing = 0,59$  cm), de áreas selecionadas, conforme descrito no item anterior.

#### 2.4.4.4. *Parâmetros biométricos*

Foram avaliados os parâmetros: altura do caule, massa seca de caule, raiz e folha e área foliar. Para obtenção da massa seca, as amostras foram desidratadas em estufa a 75 °C, pelo período de 72 h. A área foliar foi mensurada através de um integrador de área foliar (Delta-T Devices).

#### 2.4.4.5. *Quantificação de nitrogênio*

Amostras de raízes foram desidratadas em estufa a 75 °C, pelo período de 72 h e reservadas para a quantificação de nitrogênio (Bataglia et al., 1983).



## 2.5. *Análise estatística*

As médias dos dados obtidos foram submetidas ao teste de Tukey (nível de significância  $P < 0,05$ ), utilizando-se o software SAS (SAS Institute, Cary, NC).

## 2.6. *Avaliação anatômica*

Amostras da lâmina foliar de plantas tratadas e plantas controle foram fixadas em FAA<sub>50</sub>, por 48 horas, e estocadas em etanol 70% (Johansen, 1940). A porção mediana das folhas foi seccionada em fragmentos de 0.5 cm<sup>2</sup>. As amostras foram incluídas em Histosec (Merck). Cortes transversais com 10 µm de espessura foram obtidos com micrótomo rotativo de avanço automático. Parte dos cortes foi corada com safrablau (Bukatsch, 1972), para observação da estrutura geral e presença de compostos fenólicos e a outra parte com Sudan escarlate (Sass, 1951) para observação da cutícula. Posteriormente, os cortes foram montados em resina sintética (Permout).

Os cortes foram examinados em microscópio de luz e as imagens foram capturadas utilizando-se um fotomicroscópio (Modelo AX-70, OLYMPUS), com o auxílio do programa Image Pro-Discovery.

### 3.RESULTADOS

#### 3.1. Isolamento

Foram isoladas duas espécies de cianobactérias: *Brasilonema octagenarum* UFV-E1, dominante no biofilme (Fig. 1), e *Nostoc* sp. UFV- E2.

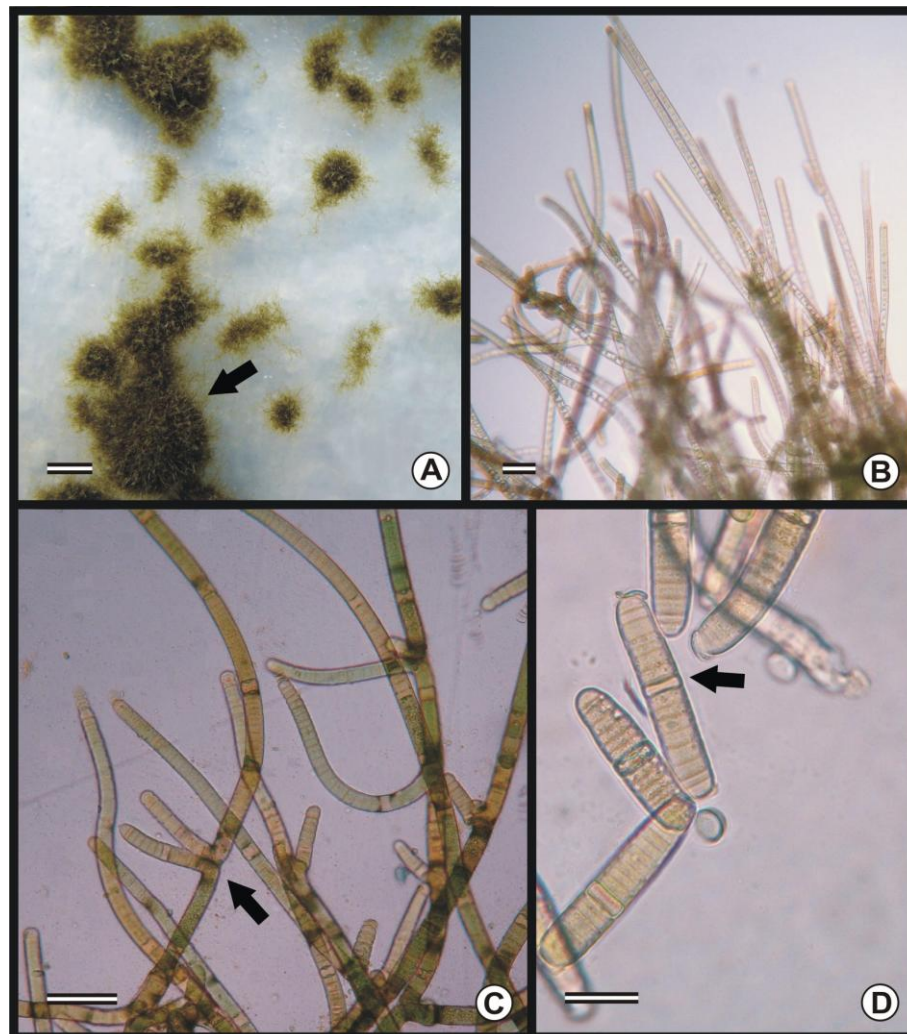


Fig. 1: A. *Brasilonema octagenarum* cultivada em meio sólido, mostrando o aspecto aveludado e denso das colônias (seta). B. *Brasilonema octagenarum* mostrando o padrão de crescimento fasciculado. C. Filamentos com ramificações falsas (seta), com coloração variando entre verde-azulado a amarelo-amarronzado. D. Filamento em fase de desenvolvimento, com heterocito (seta). Barras de escalas: A: 2 mm, B-D: 50  $\mu$ m.

### 3.2. Determinação da produção de biomassa

A curva de crescimento de *B. octagenarum* mostrou que a fase exponencial ocorreu entre o 9º e o 18º dias de cultivo, iniciando a fase estacionária a partir do 21º dia. O tempo de geração calculado para esta espécie foi de 4,7 dias (Fig. 2).

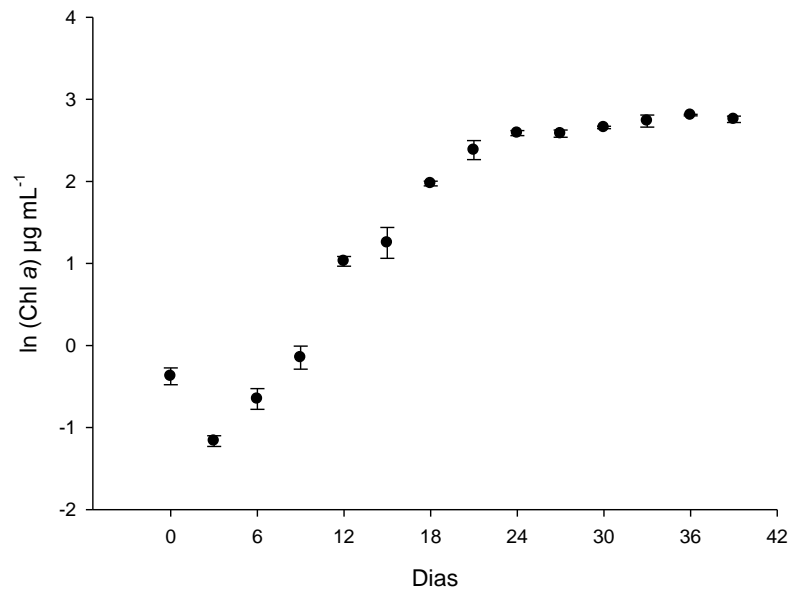


Fig. 2: Curva de crescimento de *Brasionema octagenarum* baseada no conteúdo de clorofila *a* (Chl *a*). Os pontos representam médias  $\pm$  erro padrão ( $n = 3$ ).

### 3.3. Experimento em condições semi-controladas

#### 3.3.1. Variáveis avaliadas

##### 3.3.1.1. Quantificação de colonização

Foi quantificada, na superfície foliar das plantas inoculadas, a média de 38 µg cm<sup>-2</sup> de massa seca de colônias de *B. octagenarum*.

### 3.3.1.2. Pigmentos

Os conteúdos de pigmentos (Chl *a*, Chl *b*, e carotenos) das áreas de folhas colonizadas não apresentaram alteração significativa quando comparados aos do controle (Fig. 3). A razão Chl *a/b* apresentou significativa diminuição de 19% no tratamento, em relação ao controle (Fig. 3).

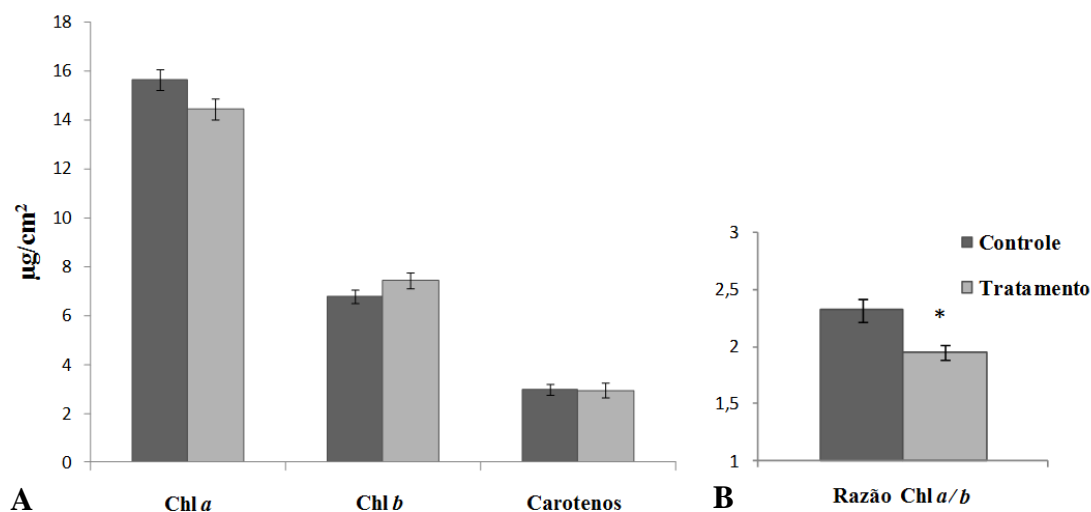


Fig. 3: Conteúdo de pigmentos de plantas de *E. urograndis* inoculadas com *B. octagenarum* (tratamento). A: clorofila *a*, *b*, carotenos. B: razão Chl *a*/Chl *b*. Efeito significativo a \*  $P \leq 0,05$  e \*\*  $P \leq 0,01$ , teste de Tukey. Barras representam médias  $\pm$  erro padrão (n = 6).

### 3.3.1.3. Compostos fenólicos totais

A média da concentração de compostos fenólicos totais extraídos das folhas de plantas inoculadas não diferiu das plantas controle (Fig. 4).

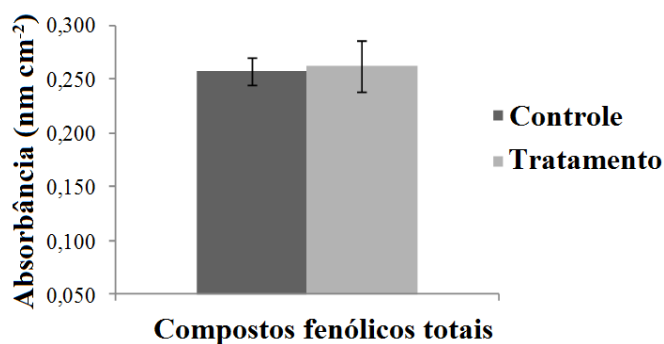


Fig. 4: Compostos fenólicos totais nas folhas de plantas de *E. urograndis* inoculadas com *B. octagenarum* (tratamento), e não inoculadas (controle). Efeito significativo a \*  $P \leq 0,05$  e \*\*  $P \leq 0,01$ , teste de Tukey. Barras representam médias  $\pm$  erro padrão (n = 6).

### 3.3.1.4. Parâmetros biométricos

Dentre os parâmetros biométricos avaliados, o tratamento com *B. octagenarum* apresentou aumento de massa seca de raiz e de caule em relação ao controle (19 % e 23%, respectivamente). As médias de massa seca de folha não apresentaram diferença significativa (Fig. 5).

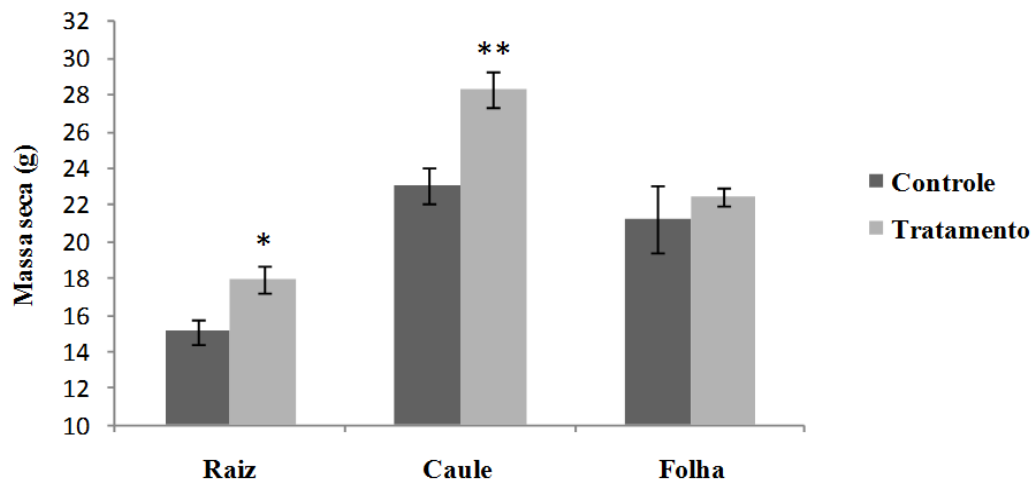


Figura 5: Massa seca de raiz, caule e folha de plantas de *E. urograndis* inoculadas com *B. octagenarum* (tratamento), e não inoculadas (controle). Efeito significativo a \*  $P \leq 0,05$  e \*\*  $P \leq 0,01$ , teste de Tukey. Barras representam médias  $\pm$  erro padrão ( $n = 6$ ).

Houve aumento significativo de 7% no valor da média de altura do caule das plantas inoculadas em relação ao controle (Fig. 6).

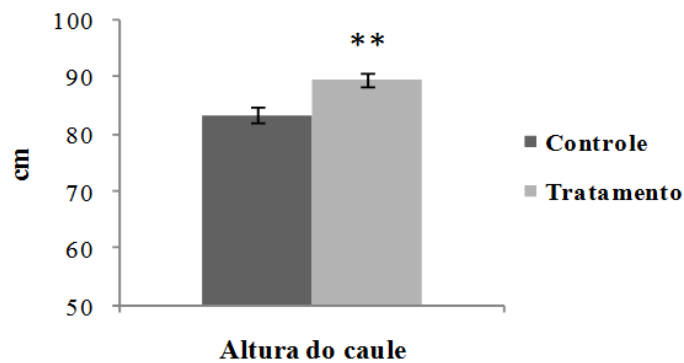


Fig. 6: Altura do caule de plantas de *E. urograndis* inoculadas com *B. octagenarum* (tratamento), e não inoculadas (controle). Efeito significativo a \*  $P \leq 0,05$  e \*\*  $P \leq 0,01$ , teste de Tukey. Barras representam médias  $\pm$  erro padrão ( $n = 6$ ).

Não houve diferença significativa entre as médias do controle e do tratamento, para a variável área foliar (Fig. 7).

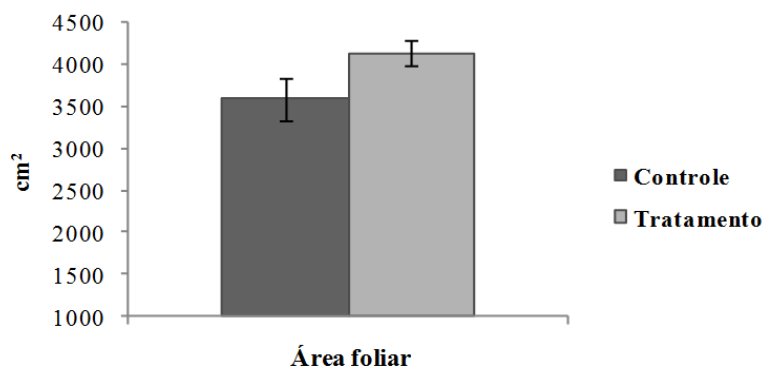


Fig. 7: Área foliar de plantas de *E. urograndis* inoculadas com *B. octagenarum* (tratamento), e não inoculadas (controle). Efeito significativo a \*  $P \leq 0,05$  e \*\*  $P \leq 0,01$ , teste de Tukey. Barras representam médias  $\pm$  erro padrão (n = 6).

### 3.3.1.5. Quantificação de nitrogênio

As médias de concentração de nitrogênio quantificadas nas raízes, das plantas controle e tratamento apresentaram-se estatisticamente iguais (Fig. 8).

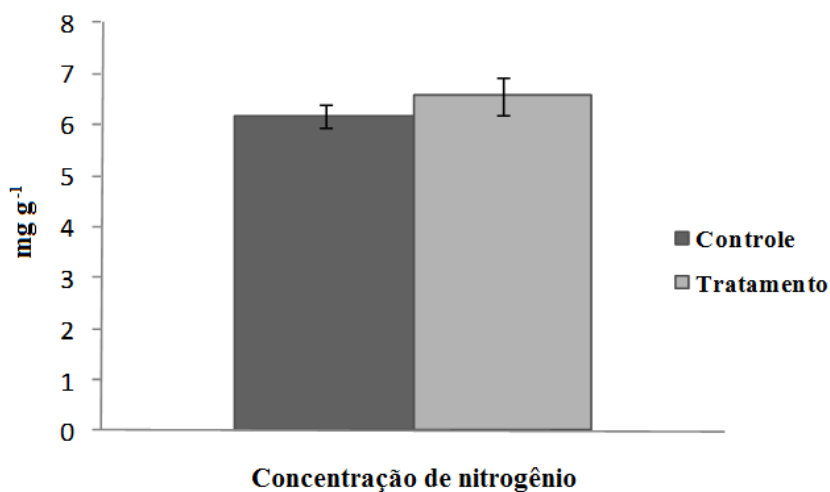


Fig. 8: Concentração de nitrogênio nas raízes de plantas de *E. urograndis* inoculadas com *B. octagenarum* (tratamento), e não inoculadas (controle). Efeito significativo a \*  $P \leq 0,05$  e \*\*  $P \leq 0,01$ , teste de Tukey. Barras representam médias  $\pm$  erro padrão (n = 6).

### 3.4. Avaliação anatômica

A colonização das folhas de *E. urograndis* por *B. octagenarum* ocorreu em pontos dispersos sobre a superfície foliar (Fig. 9 A-B). Ao remover as cianobactérias (Fig. 9 C), observou-se que as regiões recobertas pelas colônias mais densas apresentavam alteração na pigmentação (Fig. 9 D).

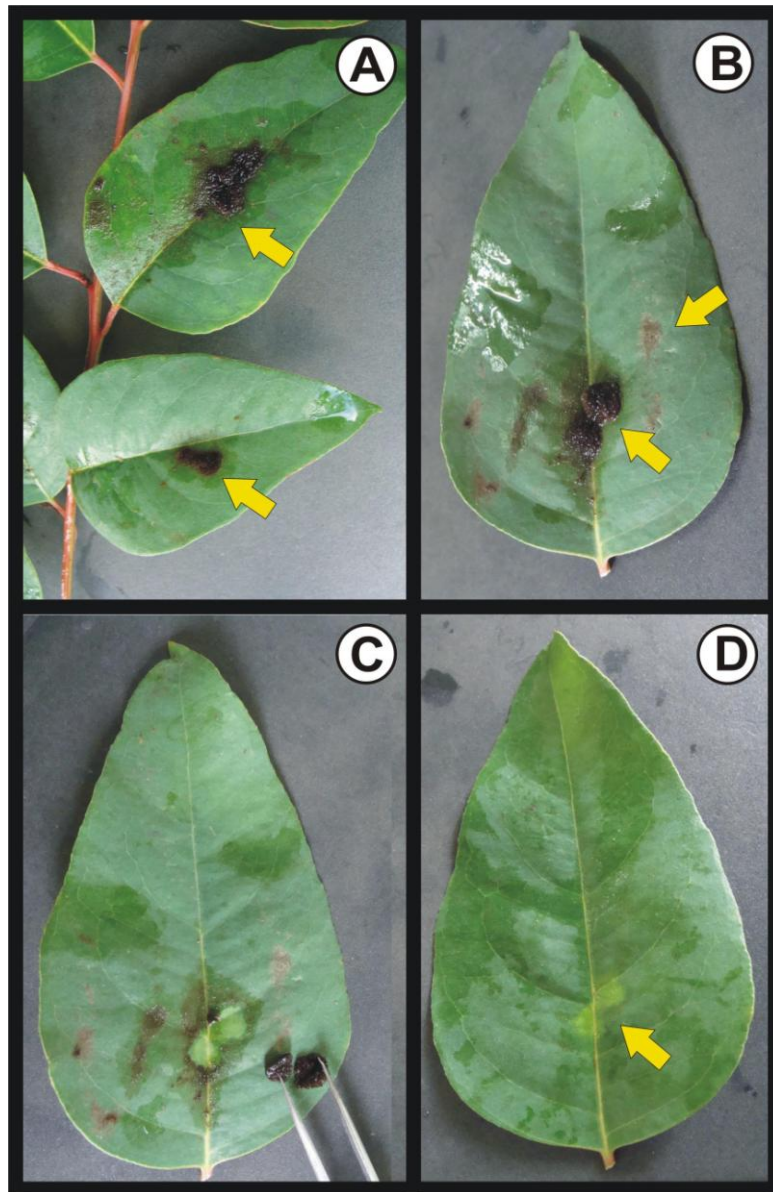


Fig. 9: Folhas de *Eucalyptus urograndis* colonizadas por *Brasilonema octagenarum*. A. Aspecto geral das folhas colonizadas. B. Colônias pontuais sobre a nervura central. C. Remoção da colônia. D. Alteração na pigmentação (seta), nas áreas recobertas por colônias mais densas.

Os cortes transversais de *E. urograndis* corados com Safrablau, mostram a constituição estrutural das folhas de plantas controle (Fig. 10 A-B). A nervura central é proeminente na face abaxial, apresentando feixe bicolateral (formato de arco fechado), colênquima subepidérmico em ambas as faces, e parênquima fundamental. (Fig. 10 A). A epiderme é uniestratificada, recoberta por cutícula, apresentando estômatos principalmente na face abaxial. O mesofilo é dorsinventral, composto de parênquima paliçádico formado por uma ou duas camadas de células, e parênquima lacunoso, formado por três a quatro camadas (Fig. 10 B).

Nas plantas inoculadas, a colonização por *B. octagenarum* ocorreu, principalmente, na face adaxial das folhas (Fig. 10 C-D). Não foram observadas alterações estruturais nas regiões da nervura central ocasionadas pela colonização (Fig. 10 C) ou no restante da lamina foliar (Fig. 10 D). A cutícula permaneceu íntegra, (Fig. 10 F-G), assim como no controle (Fig. 10 E), mesmo nas regiões em que as colônias de *B. octagenarum* eram mais densamente arranjadas (Fig. 10 G), o que pode ser verificado nos cortes corados com sudan.



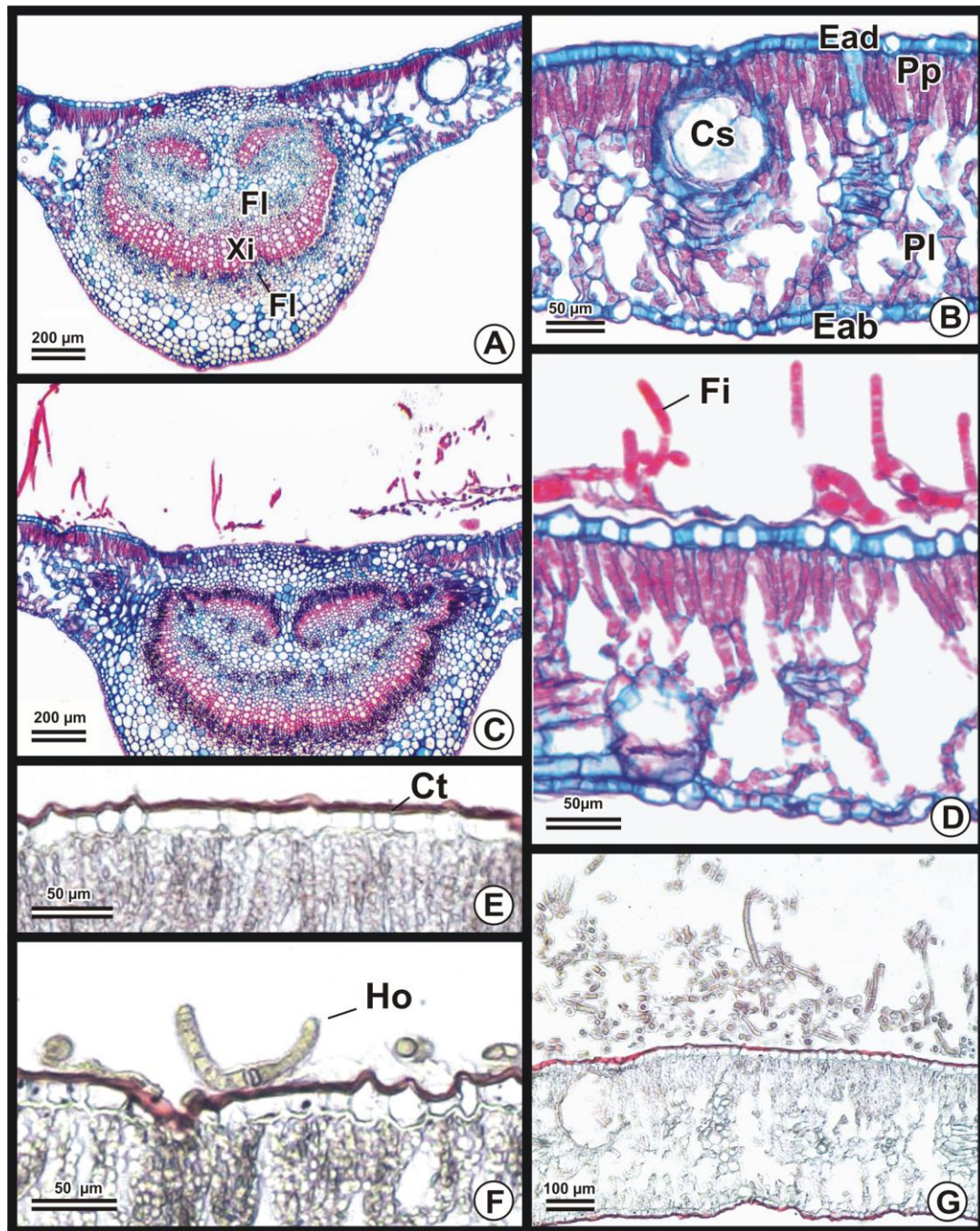


Figura 10: Fotomicrografia de cortes transversais das folhas de *Eucalyptus urograndis*, A–D: corados com Safrablau, E – G: corados com Sudan. A-B, E: Controle. C–D, F, G: Tratamento. A. Nervura central. B. Porção da lâmina foliar. C. Nervura central colonizada por *Brasilonema octagenarum*, com filamentos na face adaxial da epiderme. D. Porção da lamina foliar evidenciando o padrão de crescimento fasciculado da cianobactéria sobre a superfície adaxial. E. Epiderme com cutícula corada de vermelho-alaranjado. F. Cutícula íntegra em plantas tratadas, evidenciando o hormogônio em fase de diferenciação. G. Porção da lâmina foliar colonizada, apresentando camada densa de filamentos de *B. octagenarum* na face adaxial com cutícula íntegra. Xi: xilema; FI: floema; Ead: epiderme da face adaxial; Eab: epiderme da face abaxial; Cs: cavidade secretora; Pp: parênquima paliçádico; PI: parênquima lacunoso; Ct: cutícula; Ho: Hormogônio.

#### 4. DISCUSSÃO

Nas plantas inoculadas foram observadas colônias de *B. octagenarum*, dispersas sobre o limbo, recobrando pequenas áreas. As regiões mais densamente recobertas não apresentaram alterações no conteúdo dos diferentes tipos de clorofila, bem como na produção de carotenoides. Nestas áreas, foi observada diminuição na relação Chl *a/b*, possivelmente relacionada ao sombreamento causado pelo biofilme. O arranjo fasciculado de filamentos anastomosados, sobre o limbo, provavelmente ocasionou diminuição da incidência de luz nas regiões colonizadas e conseqüente alteração na pigmentação, comprovada pela coloração mais clara observada nestes locais. A relação Chl *a/b* tende a diminuir em resposta ao sombreamento (Boardman, 1977). Engel & Poggiani, (1991) demonstraram que em algumas espécies florestais, ocorreu diminuição da relação Chl *a/b*, a qual foi correlacionada negativamente com o sombreamento, principalmente em função do aumento relativo na proporção de Chl *b*. Tal fato está relacionado a um aumento da proporção do complexo coletor clorofila *a/b*-proteína, associado ao fotossistema II nos grana, em relação ao complexo P 700 do fotossistema I, nos tilacóides, o qual contém somente clorofila *a*-proteína (Thornber, 1975).

A síntese de compostos fenólicos, nas folhas colonizadas, não foi estimulada, fato comprovado pela análise bioquímica e anatomia foliar, na qual não foi observada reação distinta do controle. Os compostos fenólicos constituem uma barreira antimicrobiana agindo em resposta à entrada de agentes patogênicos. Como defesa bioquímica, a planta pode elevar os teores destes compostos (Nicholson & Hammerschmidt, 1992). Neste experimento, a colonização por *B. octagenarum* não eliciu tal resposta de defesa, para o período avaliado.

Entretanto, a colonização por *B. octagenarum* sobre a parte aérea de *E. urograndis* proporcionou benefícios ao crescimento da planta, o que foi evidenciado pela maior produção de massa seca de raiz e caule. Esses efeitos são similares aos ocasionados pelas rizobactérias promotoras do crescimento de plantas, quando aplicadas ao solo através do processo de biofertilização (Vessey, 2002).

Muitas espécies de rizobactérias produzem fitorreguladores como as auxinas (Khalid et al., 2004; Asghar et al., 2002) e citocininas (Perrig et al., 2007). Em cianobactérias, essa propriedade também tem sido confirmada. Stirk et al. (1999) identificaram a citocinina isopenteniladenina em *Arthronema africanum* (Cyanobacteria, Oscillatoriales). Sergeeva et al. (2002) confirmaram a produção de auxinas por várias espécies de cianobactérias pertencentes, principalmente, ao gênero *Nostoc* (Cyanophyta, Nostocales).

A fertilização com cianobactérias, em cultivos de arroz irrigado, tem resultado em um aumento da produção de biomassa. Tal benefício está relacionado, entre outros fatores, à fixação biológica do nitrogênio e à produção de substâncias promotoras do crescimento por estes microrganismos, como documentado por Roger & Kulasooriya, (1980).

Neste estudo, o aumento da produção de biomassa nas raízes das plantas inoculadas poderia ter ocorrido em resposta a substâncias nitrogenadas (resultantes do processo de fixação biológica do N), liberadas por *B. octagenarum*, e que podem ter sido absorvidas, pelos tecidos da planta. No entanto, não foi registrado aumento na concentração de nitrogênio nas raízes das plantas inoculadas.

O estímulo ao crescimento vegetal, ocasionado pelas cianobactérias, tem sido observado em plantas de trigo, quando esses microrganismos são utilizados como biofertilizantes no substrato (Karthikeyan, et al., 2007), ou em experimentos tratando-se sementes de tremoço (*Lupinus termis*) com filtrado de culturas de cianobactérias (Haroun & Hussein, 2003). Tais estímulos também foram observados em culturas de tecidos de plantas, como ervilha, tabaco, beterraba (Molnár & Ördög, 2005), neem (Devi, et al., 2008) e pinhão-manso (Shrivastava et al., 2009). Nestas pesquisas, os efeitos observados foram atribuídos à produção e liberação de reguladores do crescimento vegetal pelas cianobactérias.

Os resultados obtidos relativos às conseqüências da colonização por *B. octagenarum*, em folhas de *Eucalyptus urograndis*, diferiram daqueles encontrados no trabalho de Aguiar et al. (2008), no qual foi descrita a nova espécie *B. octagenarum*. Naquele estudo, foi apresentada uma descrição da anatomia foliar de plantas colonizadas que permaneceram por períodos longos no viveiro (acima 12 meses), sob

condições de pleno sol e sistema de irrigação por aspersão, em intervalos de uma hora. A elevada umidade associada à luz plena, versus o longo tempo de permanência das mudas no viveiro, foram fatores determinantes para que a colonização por *B. octagenarum* se instalasse e chegasse a recobrir praticamente toda a parte aérea das plantas, incluindo folhas, caules e gemas. Nestas condições, a maioria das plantas apresentaram lesões necróticas no limbo foliar.

Várias espécies de cianobactérias são capazes de formar biofilmes na superfície de monumentos históricos, causando a degradação do substrato devido à produção e liberação de ácidos orgânicos e de substâncias resultantes do processo de fixação biológica do nitrogênio (Macedo et al., 2009).

As cianobactérias pertencentes à Ordem Nostocales (como *B. octagenarum*), contribuem com grande parte do processo de conversão do N atmosférico em amônia. A amônia, quando liberada na presença de água, pode ser oxidada por bactérias nitrificantes, formando ácido nítrico, que é altamente corrosivo (Murphy, 2002). Além disso, os polímeros extracelulares produzidos pelas cianobactérias, de maneira geral, servem como fonte de energia para o crescimento de bactérias heterotróficas que contribuem para a solubilização do substrato (Albertano & Urzi, 1999). Em sua pesquisa, Aguiar et al. (2008) sugeriram que a formação do biofilme denso de *B. octagenarum* pode ter contribuído, de forma direta, para a ocorrência das lesões: limitando a penetração de luz para a realização da fotossíntese e liberando substâncias com efeitos corrosivos, e de forma indireta: proporcionando a formação de um microambiente favorável ao desenvolvimento de bactérias e fungos.

No presente estudo, dois fatores devem ter contribuído, de forma significativa, para o não surgimento de lesões necróticas nas folhas durante o período de condução dos experimentos. Primeiro, o curto período de exposição das plantas à colonização por *B. octagenarum* e, segundo, a presença de colônias de pequenas dimensões, formadas no limbo, em função do curto período amostrado. Tais condições minimizaram efetivamente os efeitos danosos que foram descritos por Aguiar et al. (2008).

No presente estudo, observou-se que em áreas colonizadas por *B. octagenarum*, houve alteração na relação clorofila *a/b*, resposta ocasionada,

possivelmente, pelo efeito do sombreamento. Se o tempo de permanência das plantas, sob condições de intensa umidade fosse maior, a área do limbo foliar colonizada poderia atingir maiores dimensões, com o crescimento das colônias, e conseqüente diminuição da incidência de luz no limbo. Desta forma, a colonização poderia prejudicar efetivamente o processo fotossintético, e comprometer o balanço fonte-dreno.

A colonização por *B. octagenarum*, em plantas de *Eucalyptus urograndis*, em estágios iniciais, ocorreu como uma relação de epifitismo, sem ocasionar efeitos prejudiciais, ou eliciar respostas de defesa nas plantas. Essas tiveram seu crescimento estimulado, possivelmente, em resposta à presença de fitorreguladores de crescimento, produzidos pela cianobactéria.

Estas constatações estão diretamente relacionadas às condições em que as plantas foram avaliadas, nas quais não houve fatores limitantes ao crescimento. Diferentemente do que foi observado em plantas que permaneceram por longos períodos de tempo, em condições favoráveis ao estabelecimento/desenvolvimento da colonização, quando essa passou a atuar como um fator de estresse, comprometendo o balanço fonte - dreno das plantas de eucalipto.

## 5. REFERÊNCIAS

Aguiar R. M. (2000) *Systematics and Ultrastructure of New and Rare Chrysophytes from Colorado and Wyoming Lakes*. Ph.D Thesis, Colorado State University, Fort Collins.

Aguiar R., Fiore M. F., Franco M. W., Ventrella M. C., Lorenzi A. S., Vanetti C. A. & Alfenas A. C. (2008) A novel epiphytic cyanobacterial species from the genus *Brasilonema* causing damage to *Eucalyptus* leaves. *J. Phycol.* 44, 1322–1334.

Albertano P. & Urzi C. (1999) Structural interactions among epilithic cyanobacteria and heterotrophic microorganisms in Roman hypogea. *Microbiol. Ecology* 38, 244-252.

Allen, M. M. (1973) Methods for cyanophyceae. *Handbook of Phycological Methods, Culture Methods and Growth Measurements* (STEIN J.K., ed.), pp. 127-138. Cambridge University Press, New York, NY.

Asghar H. N., Zahir Z. A., Arshad M. & Khaliq A. (2002) Relationship between *in vitro* production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. *Biol Fertil Soils* 35, 231–237.

Bataglia O. C., Furlani A. M. C., Teixeira J. P. F., Furlani P. R. & Galo J. R. (1983) *Métodos de Análise Química de Plantas*. Boletim Técnico nº 78. Instituto Agrônômico de Campinas. Campinas, SP.

Berman-Frank I., Lundgren P. & Falkowski P. (2003) Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. *Res. Microbiol.* 154, 157-164.

Boardman N. K. (1977) Comparative photosynthesis of sun and shade plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 28, 355-77.

Bukatsch, F. (1972) Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. *Mikrokosmos*, 61 (8) 255.

Devi B. P., Vimala A., Sai I. & Chandra S. (2008) Effect of cyanobacterial elicitor on neem cell suspension cultures. *Indian J.Sci.Technol.* 1 (7), 1-5.

Engel V. L. & Poggiani F. (1991) Estudo da concentração de clorofila nas folhas e seu espectro de absorção de luz em função do sombreamento em mudas de quatro espécies florestais nativas. *Rev. Bras. Fisiol. Vegetal* 3(1), 39-45.

Fiore M. F., Sant'Anna C. L., Azevedo M. T. P., Komárek J., Kaštovský J. S. & Lorenzi A. S. (2007) The cyanobacterial genus *Brasilonema*, gen. Nov., a molecular and phenotypic evaluation. *J. Phycol.* 43, 789-798.

Gantar M., Kerby N. W. & P. Rowell. (1991) Colonization of wheat (*Triticum vulgare* L.) by N<sub>2</sub>-fixing cyanobacteria: II. An ultrastructural study. *Phytol.*, 118, 485-492.

Haroun S. A. & Hussein M. H. (2003) The promotive effect of algal biofertilizers on growth, protein pattern, and some metabolic activities of *Lupinus termis* plants grown in siliceous soil. *Asian J. Plant Sci.* 2 (13), 944-951.

Hrouzek P. & Šoun J. (2004) Some finds of subaerophytic cyanobacteria on wetted walls of La Palma (Canary Islands). *Czech Phycology* 4, 155-162.

Johansen, D.A. (1940) *Plant microtechnique*. McGraw-Hill Book Co.Inc, New York.

Karthikeyan N., Prasanna R., Nain L. & Kaushik B. D. (2007) Evaluating the potential of plant growth promoting cyanobacteria as inoculants for wheat. *Eur. J. Soil Biol.* 43, 23-30.

Kugrens P., Clay B. L., Aguiar R. (2000) Ultrastructure of *Lobocharacium coloradoense*, Gen. Et. SP. NOV. (Chlorophyta, Characiosiphonaceae), an unusual coenocyte from Colorado. *J. Phycol.* 36, 421-432.

Lee, R.E. (2008) *Phycology*. 3<sup>rd</sup> Ed. Cambridge University Press, Cambridge.

Khalid A., Arshad M. & Zahir Z. A. (2004). Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *Eur. J. Appl. Microbiol.* 96, 473–480.

Macedo M. F., Miller Z. A., Dionísio A. & Saiz-Jimenez C. (2009) Biodiversity of cyanobacteria and green algae on monuments in the Mediterranean Basin: an overview. *Microbiology* 155, 3476-3490.

Meeks J. C. & Castenholz R. W. (1971) Growth and photosynthesis in the extreme thermophile, *Synechococcus lividus* (Cyanophyta). *Arch. Microbiol.* 78, 25-41.

Molnár Z. & Ördög V. (2005) Microalgal and cyanobacterial extracts in the tissue cultures of higher plants (pea, tobacco, beet). *Acta Biol. Szeged.* 49 (1-2), 39-40.

Murphy, C. (2002) Blue-green algae and its effect on fiber-cement roofing within a microclimate. *Interface* 20: 4–12.

Nicholson R. L., Hammerschmidt R. (1992) Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30, 369-389.

Perrig D., Boiero M. L., Masciarelli O. A., Penna C., Ruiz O. A., Cassán F. D. & Luna M. V. (2007) Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 75:1143–1150.

Roger P. A. & Kulasooriya S. A. 1980. *Blue-green algae and Rice*. The international Rice Institute. Manila.

Salveit M. E. (2004). Effects of 1-methylcyclopropene on phenylpropanoid metabolism, the accumulation of phenolic compounds and browning of whole and fresh cut iceberg lettuce. *Postharvest Biol. Technol.* 34, 75-80.

Sass, J. E. (1951) *Botanical microtechnique*. 2. ed. Ames, The Iowa State College Press, IA.

Sergeeva E., Liaimer A. & Bergman B. (2002) Evidence for production of the phytohormone indole-3-acetic acid by cyanobacteria. *Planta* 215, 229-238.

Shrivastava S. & Banerjee M. (2009) Algal filtrate: a low cost substitute to synthetic growth regulators for direct organogenesis of embryo culture in *Jatropha curcas* (Ratanjyot). *Acta Physiol. Plant.* 31, 1205-1212.

Thornber, J.P. (1975) Chlorophyll-proteins: light-harvesting and reaction center components of plants. *Annu. Rev. Plant Phys.* 26, 127-58.

Tsavkelova E. A., Lobakova E. S., Kolomeitseva G. L., Cherdyntseva T. A. & Netrusov A. I. (2003) Localization of associative cyanobacteria on the roots of epiphytic orchids. *Microbiology* 72 (1), 99-104.

Vessey J. K. (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* 255, 571-586.

Welburn A. R. (1994). The spectral determination chlorophyll *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvent with spectrophotometers different of resolutions. *J. Plant Physiol.* 144, 307-313.



## CAPÍTULO II

**Identificação e atividade biológica de substâncias produzidas  
por *Brasilonema. octagenarum* UFV-E1 (Cyanobacteria) no  
enraizamento de mini-estacas de eucalipto**

# Identificação e atividade biológica de substâncias produzidas por *Brasilonema octagenarum* (Cyanobacteria) UFV-E1, no enraizamento de mini-estacas de eucalipto

---

## Resumo

Neste trabalho foi investigada a produção de substâncias bioativas, com possíveis efeitos similares aos dos fitorreguladores do crescimento vegetal, pela nova espécie de cianobactéria *B. octagenarum*, encontrada colonizando plantas de eucalipto spp., em viveiro de produção de mudas clonais. Foram avaliados os efeitos da inoculação com esta cianobactéria em mini-estacas de *E. urophylla* e *E. urograndis*. O extrato de células de *B. octagenarum* foi analisado em cromatógrafo líquido acoplado a espectrômetro de massa, LC-MS/MS. O concentrado de células de *B. octagenarum* foi aplicado sobre a parte aérea de mini-estacas, e o controle consistiu de estacas não inoculadas. O experimento foi conduzido sob condições de umidade e temperatura controladas. Houve aumento na produção de massa seca de raiz (31 %) e de caule (44 %), na espécie *E. urophylla*. A análise em LC-MS/MS revelou a presença do ácido indol-3-acético (AIA) no extrato de células de *B. octagenarum*, o que possivelmente tenha ocasionado o estímulo na produção de raízes pelas mini-estacas. Sugere-se que *B. octagenarum* possui potencial para ser utilizada no desenvolvimento de técnicas de propagação vegetativa, na cultura do eucalipto, como fonte de AIA.

Palavras-chave: *Brasilonema octagenarum*, cianobactéria, *Eucalyptus*, enraizamento, mini-estacas, auxina.

---

## **Identification and biological activity of compounds produced by the cyanobacteria *Brasilonema octagenarum* (UFV-E1) on mini-cutting rooting of *Eucalyptus* spp.**

---

### **Abstract**

The production of bioactive compounds, with similar effects to those of phytohormones, was investigated in this research, in a new species of cyanobacteria, *B. octagenarum* UFV-E1, described colonizing *Eucalyptus* spp in the nursery production of cloned plants. The effects of cyanobacterial inoculation in mini-cuttings of *E. urophylla* and *E. urograndis* was evaluated. The extract of *B. octagenarum* cells was analyzed on a liquid chromatography coupled with a mass spectrophotometer, LC-MS/MS. Concentrated solutions of *B. octagenarum* was applied over the aerial part of the mini-cuttings, whereas the control group consisted of cuttings without inoculation. The experiment was carried out under controlled conditions of humidity and temperature. There was an increase in the production of root and stem dry mass (31% and 44%, respectively) in the *E. urophylla* species. The LC-MS/MS analysis revealed the presence of indol-3-acetic acid (IAA) in the cell extract of *B. octagenarum*, which possibly caused the stimulation of the root production in the cuttings. It is suggested that the *B. octagenarum* has the potential to be used in developing techniques for vegetative propagation of the *Eucalyptus* plants, as a source of IAA.

Key words: *Brasilonema octagenarum*, cyanobacteria, *Eucalyptus*, rooting, mini-cuttings, auxin.

---

## 1. INTRODUÇÃO

As cianobactérias produzem uma grande diversidade de substâncias de interesse econômico-industrial, referidos como “metabólitos secundários” ou “substâncias bioativas”, uma expressão ampla, de uso comum, que inclui substâncias que podem, em baixas concentrações, afetar os processos metabólicos vitais de outros organismos, seja de forma benéfica ou prejudicial (Skulberg, 2000).

Os benefícios para o crescimento de plantas proporcionado pelas cianobactérias são conhecidos há muitos anos (Roger & Kulasooriya, 1980). Quando utilizadas como biofertilizantes, em campos de arroz alagado, estes microrganismos enriquecem o solo através da fixação biológica do nitrogênio ( $\text{FBN}_2$ ), aumentam a disponibilidade de fósforo, e auxiliam na formação de agregados (Vaishampayan et al., 2001). Além disso, o aumento da produtividade em plantações de arroz inundado, utilizando-se a fertilização com cianobactérias, tem sido atribuído à presença de substâncias bioativas, tais como vitaminas e reguladores do crescimento vegetal, liberadas no meio (Roger & Kulasooriya 1980; Chauhan & Gupta, 1983; Roger et al., 1993).

Já foram confirmadas a síntese de auxinas (Sergeeva et al., 2003) e citocininas (Stirk et al., 1999, Chauhan & Gupta, 1983) pelas cianobactérias. Também, tem sido relatada a produção, por esses microrganismos, de substâncias com efeitos similares aos dos fitorreguladores (Haroun & Hussein, 2003).

O potencial das cianobactérias de estimularem o crescimento, em culturas de tecidos, tem sido confirmado por várias pesquisas. Foi observado, como resultado do tratamento com extratos intra ou extracelulares de cianobactérias, aumento da formação de calos e retardamento da senescência em culturas de tecido de plantas ornamentais, (Zaccaro et al., 2006); aumento da biomassa de células de neem em culturas em suspensão (Devi et al., 2008) e indução de organogênese em embriões de pinhão manso (Shrivastava & Banerjee, 2009), em embriões de cenoura (Wake et al., 1992) e em calos de arroz (Manickavelu et al., 2006). Tais resultados foram atribuídos à produção e liberação de reguladores do crescimento vegetal produzidos pelas cianobactérias.

Zaccaro et al. (2006) demonstraram que os produtos extracelulares da cianobactéria *Scytonema hofmanni* estimularam a regeneração e retardaram a senescência

de bulbos de lírio (*Lilium alexandrae*), em propagação *in vitro*, resultando em um efeito similar ao do fitorregulador sintético ácido naftaleno acético (ANA). Estes pesquisadores sugeriram a possibilidade de substituí-lo pelo extrato da cianobactéria, já que o ANA possui efeitos tóxicos para o operador.

Muitas técnicas de propagação vegetativa, em escala comercial, utilizam fitoregulares tais como o ácido indol butírico (AIB), o ANA, e o ácido indol-3-acético (AIA) De Klerk et al., 1999. A utilização destes fito-estimuladores representa uma forma de aumentar a eficiência das técnicas de propagação em massa, como a clonagem do *Eucalyptus* spp, a partir de mini ou micro-estacas (Lana et al., 2008; Fogaça & Fett-Neto, 2005).

A capacidade de produção de raízes adventícias, pelo material vegetal, constitui um fator limitante para obtenção de mudas de boa qualidade. Mudanças robustas e que apresentam raízes bem desenvolvidas são mais adaptadas às condições de estresse ambiental, garantindo maiores taxas de sobrevivência no campo (Freitas et al., 2005).

Os benefícios ao crescimento de plantas, proporcionado pelas cianobactérias, são conhecidos há muito anos, porém, somente nas últimas décadas foram apresentadas pesquisas que confirmaram efetivamente a produção de fitorreguladores do crescimento vegetal por estes microrganismos. A utilização de substâncias produzidas pelas cianobactérias, em técnicas de propagação vegetativa, é uma linha de pesquisa bastante recente e ainda pouco explorada pelas ciências biológicas.

Neste contexto, as cianobactérias podem representar uma fonte natural de fitorreguladores do crescimento vegetal, que estimulam a formação de raízes adventícias em mini-estacas de *Eucalyptus* spp.

Um dos testes frequentemente utilizados para determinar a atividade reguladora do crescimento vegetal, de uma substância de interesse, é a realização de bioensaios. Especificamente, para determinar a atividade de auxinas, são utilizados testes de promoção do crescimento das radículas de vegetais, tais como o alface (*Lactuca sativa*), o pepino (*Cucumis sativus*) e o rabanete (*Raphanus sativus*) (Rosa, 2002; Marchi, 2004).

Este trabalho baseou-se nas hipóteses de que a nova espécie de cianobactéria, subaerofítica, *Brasilonema octagenarum* UFV-E1, recentemente descrita em viveiro de produção de mudas clonais de *Eucalyptus* spp (Aguiar et al, 2008), produz fitoregulares

do crescimento e, que tais reguladores, sejam capazes de estimular o enraizamento de mini-estacas de *Eucalyptus* spp.

Para testar tais hipóteses, o presente trabalho teve como objetivos: (i) testar a atividade reguladora do crescimento vegetal de produtos extracelulares de *B. octagenarum*, através de bioensaios, (ii) investigar os efeitos das substâncias sobre o desenvolvimento de mini-estacas de eucalipto, e (iii) identificar, quimicamente, as substâncias ativas presentes.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Cultivo de *B. octagenarum*

O cultivo de *B. octagenarum* foi realizado em meio BG-11 líquido (Allen, 1973), não suplementado com nitrogênio (N), com aeração constante, em sala de crescimento, sob condições fotoautotróficas (temperatura de  $25 \pm 2^\circ \text{C}$ , fotoperíodo de 16/8 h de luz/escuro e irradiância média de  $115 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ).

### 2.2. Obtenção da solução contendo PEC

O extrato contendo os produtos extracelulares (PEC), utilizado no bioensaio, foi obtido filtrando-se culturas de *B. octagenarum*, na fase estacionária (30 dias de cultivo), sendo parte autoclavado por 20 min, e parte não autoclavado.

### 2.3. Bioensaio - crescimento de radículas de alface expostas aos produtos extracelulares de *B. octagenarum*

Sementes comerciais de alface (*Lactuca sativa*), variedade Regina de Verão (ISLA) foram acondicionadas em placas de Petri forradas com papel germitex umedecidos com 2,5 mL de água desionizada. Após 14 h, foram selecionadas as sementes que estavam iniciando a emissão da radícula. As sementes foram colocadas em novas placas de Petri (trinta sementes por placa) forradas com papel germitex. Em seguida, foram aplicados os

tratamentos: PEC autoclavado, PEC não-autoclavado, meio BG-11, e água desionizada (controle), cada um com três repetições. Foram realizadas três avaliações no decorrer de 12, 24 e 36 horas, a partir da aplicação dos tratamentos.

As placas foram acondicionadas em câmara de germinação (BOD-Forma Scientific), à temperatura de 28 °C e fotoperíodo de 12 h. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial de quatro tratamentos e três intervalos de tempo.

Os resultados foram analisados através da análise de variância (ANOVA) e expressos em porcentagem de estimulação do alongamento do sistema radicular, calculado em relação ao controle.

#### 2.4. *Experimento com mini-estacas em condições semi-controladas*

##### 2.4.1. *Obtenção de inóculo*

Culturas de *B. octagenarum*, obtidas como descrito previamente (item 2.1), foram filtradas e concentradas em 10% do volume inicial, utilizando-se o mesmo meio em que a cultura foi obtida.

##### 2.4.2. *Obtenção do material vegetal*

O material vegetal foi obtido no viveiro experimental do Departamento de Engenharia Florestal (DEF), da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa- MG. Foram utilizados neste experimento *Eucalyptus urophylla* (U1179) e o híbrido *E. urograndis* (2277). As mini-estacas, com 12 cm de altura, foram coletadas em jardim clonal suspenso (com seis folhas cortadas pela metade), e acondicionadas em caixas de isopor contendo água.

### 2.4.3. Inoculação

Após a obtenção do material vegetal, este foi estaqueado em tubetes (30 × 125 mm) contendo substrato (MECPLANT) adubado na proporção de 8,33 g de substrato: 1 g de OSMOCOT (19-06-10): 2g de SUPERFOSFATO SIMPLES (00-18-00). O tratamento consistiu em gotejar, sobre as estacas, com auxílio de uma pipeta plástica, 3 mL de inóculo de *B. octagenarum*. Foram realizadas três aplicações, sendo a primeira no dia da montagem do experimento e as demais, no decorrer de quinze e trinta dias subsequentes. O experimento foi realizado em casa de vegetação, com nevoeiro intermitente. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial de dois tratamentos e duas espécies, sendo cada tratamento com doze repetições.

### 2.4.4. Variáveis avaliadas

#### 2.4.4.1. Quantificação de colonização

As colônias de cianobactérias foram removidas do limbo foliar e recolhidas para a quantificação, sendo o valor expresso como massa seca de cianobactérias por área foliar.

#### 2.4.4.2. Conteúdo de pigmentos

O conteúdo dos pigmentos: clorofila *a* (Chl *a*), clorofila *b* (Chl *b*) e carotenóides foi determinado coletando-se discos de folhas frescas ( $\emptyset = 0,59$  cm) e utilizando-se dimetilsulfóxido (DMSO), como extrator, de acordo com Wellburn (1994). Utilizou-se a porção mediana de folhas que terminaram o processo de amadurecimento, após a inoculação.

#### 2.4.4.3. Parâmetros biométricos

Ao final do experimento foram avaliados os parâmetros biométricos: altura do caule, massa seca de caule, raiz e folha, e a área foliar. Para obtenção da massa seca,



as amostras foram desidratadas em estufa a 75 °C, pelo período de 72 h. A área foliar foi mensurada através de um integrador de área foliar (Delta-T Devices).

### 2.5. Análises estatísticas

As médias dos dados obtidos foram comparadas através do teste de Tukey (nível de significância  $P < 0,05$ ), utilizando o programa SAS (SAS Institute, Cary, NC).

### 2.6. Identificação das substâncias bioativas

Para obtenção do extrato, a partir da biomassa de células de *B. octogenarum*, culturas com 30 trinta dias de cultivo foram filtradas em papel Watman N° 54, com  $\text{Ø} = 25 \mu\text{m}$  de abertura dos poros. A biomassa foi desidratada a 75 °C, por 24 h, em estufa com circulação de ar forçada. O extrato foi obtido a partir de 1 g de biomassa seca, utilizando-se etanol 80% como agente extrator, e concentrado em rotaevaporador. O extrato obtido foi filtrado em membrana Millipore (0,22  $\mu$ ). Quinhentos mililitros do extrato foram adicionados a 500  $\mu\text{l}$  de uma solução de metanol : ácido fórmico (50 : 0,1). Adotou-se a mesma metodologia para a preparação da amostra do padrão (ácido indol-3-acético). As amostras foram analisadas em LC-MS/MS (Agilent 6410 MS acoplada a um HPLC Agilent 1200 controlado pelo programa Agilent MassHunter). O modo utilizado foi de inserção direta e os picos analisados por MS em ESI (electrospray ionization) modo MRM (*Multiple reaction monitoring*). O fluxo utilizado foi de 0,3 ml min<sup>-1</sup>. A voltagem do cone foi de 50 V e detector em modo positivo. A varredura dos íons foi de 100 a 1.200 Da. A energia de colisão utilizada para fragmentação foi de 30 eV. Os fragmentos foram gerados e identificados por comparação com o perfil de fragmentação do padrão. As análises foram realizadas no laboratório de Ecotoxicologia do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), da Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Avaliação do crescimento de radículas de alface

Os tratamentos contendo produtos extracelulares de cianobactérias (PEC) estimularam o crescimento da radícula em sementes de alface (ANOVA,  $P < 0,05$ ). Após 36 horas, as radículas dos tratamentos PEC não autoclavado e PEC autoclavado atingiram o comprimento de 54% e 62% maior, respectivamente, em relação ao controle (Fig. 1 e 2).



Fig. 1: Sementes de alface, decorridas 36 h de aplicação dos tratamentos: A. Água desionizada. B. Meio BG-11. C. PEC autoclavado. D. PEC não autoclavado.

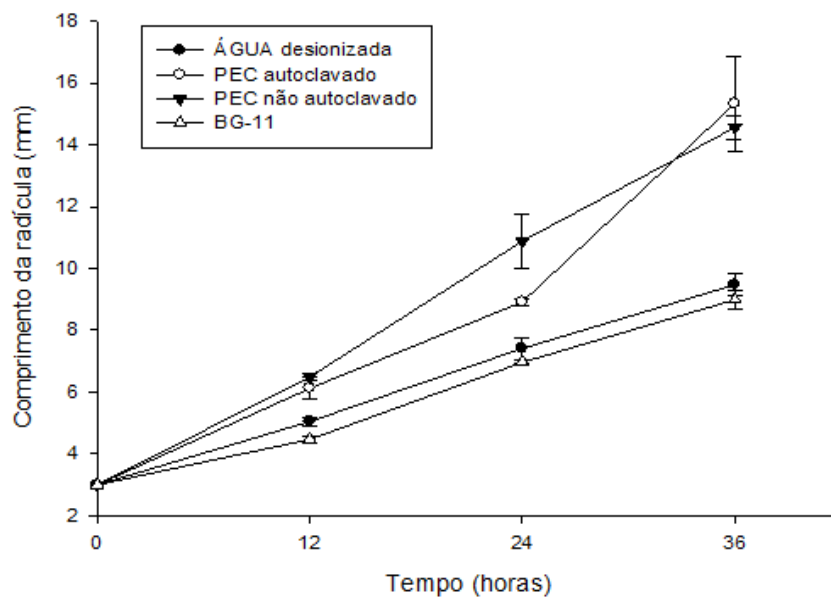


Fig. 2: Efeitos de produtos extracelulares (PEC) de *B. octogenerum* sobre o crescimento da radícula em sementes de alface. Os pontos representam médias  $\pm$  desvio padrão ( $n=3$ ).

### 3.2. Experimento em condições semi-controladas

#### 3.2.1. Conteúdo de pigmentos

O conteúdo de pigmentos (Chl *a*, Chl *b* e carotenos) nas estacas inoculadas não apresentou alteração significativa quando comparadas com o controle (Fig. 3).

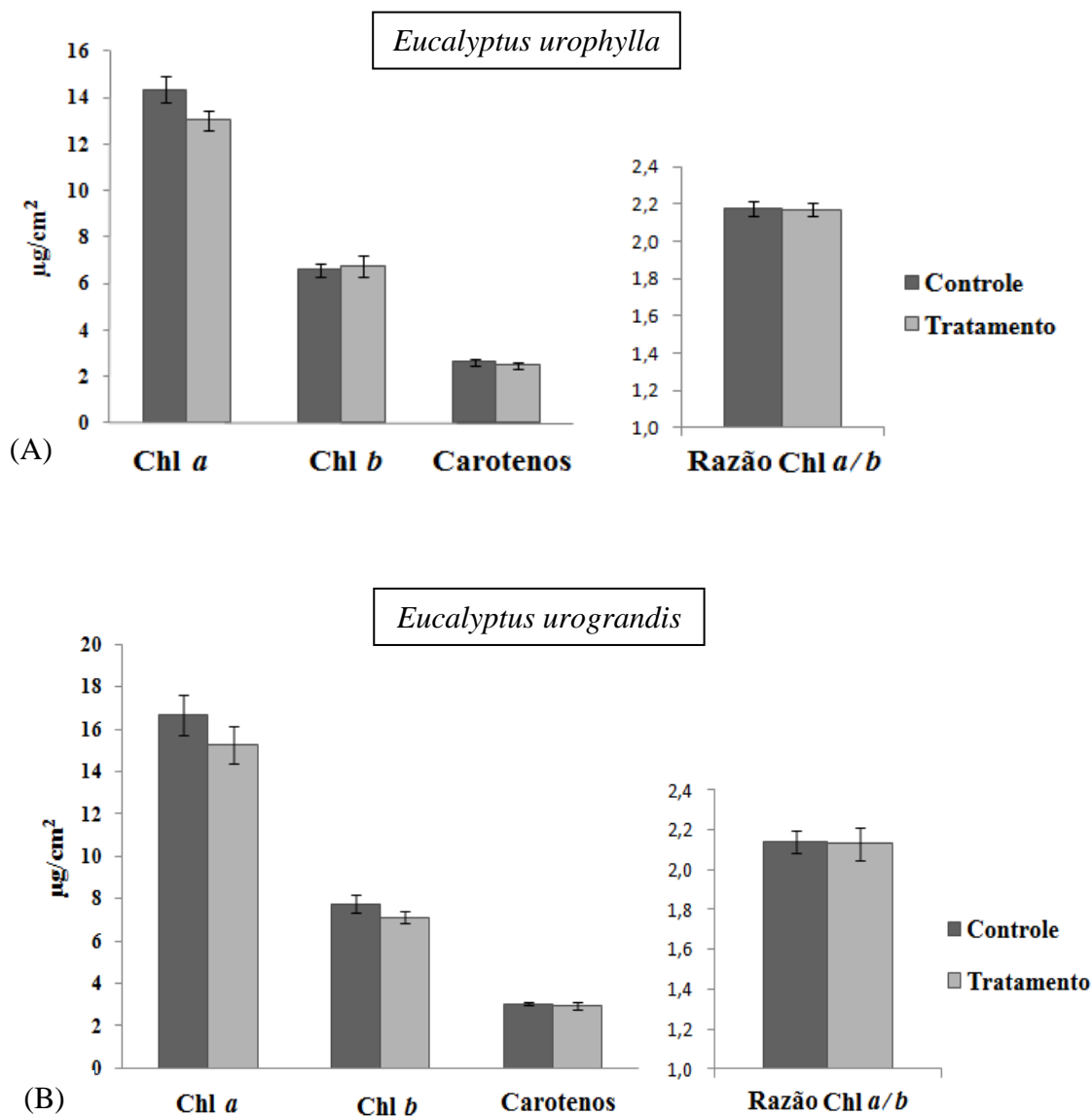


Fig. 3: Conteúdo de clorofila *a*, *b*, carotenos e razão Chl *a* /Chl *b* de estacas inoculadas com *B. octagenarum* (tratamento) e não-inoculadas (controle). A. *E. urophylla*. B. *E. urograndis*. Efeito significativo a \*  $P \leq 0,05$  e \*\*  $P \leq 0,01$ , teste de Tukey. Barras representam médias  $\pm$  erro padrão (n = 5).

### 3.2.2. Parâmetros biométricos

O tratamento com inoculação de células de *B. octagenarum*, em *E. urophylla*, apresentou aumento significativo de massa seca de raízes e de caule em relação ao controle (31 e 44%, respectivamente), ao passo que a variável massa seca de folhas não apresentou diferença significativa (fig. 4 A). As médias obtidas para massa seca de raiz, caule e folhas em *E. urograndis* não apresentaram diferenças (Fig. 4 B).

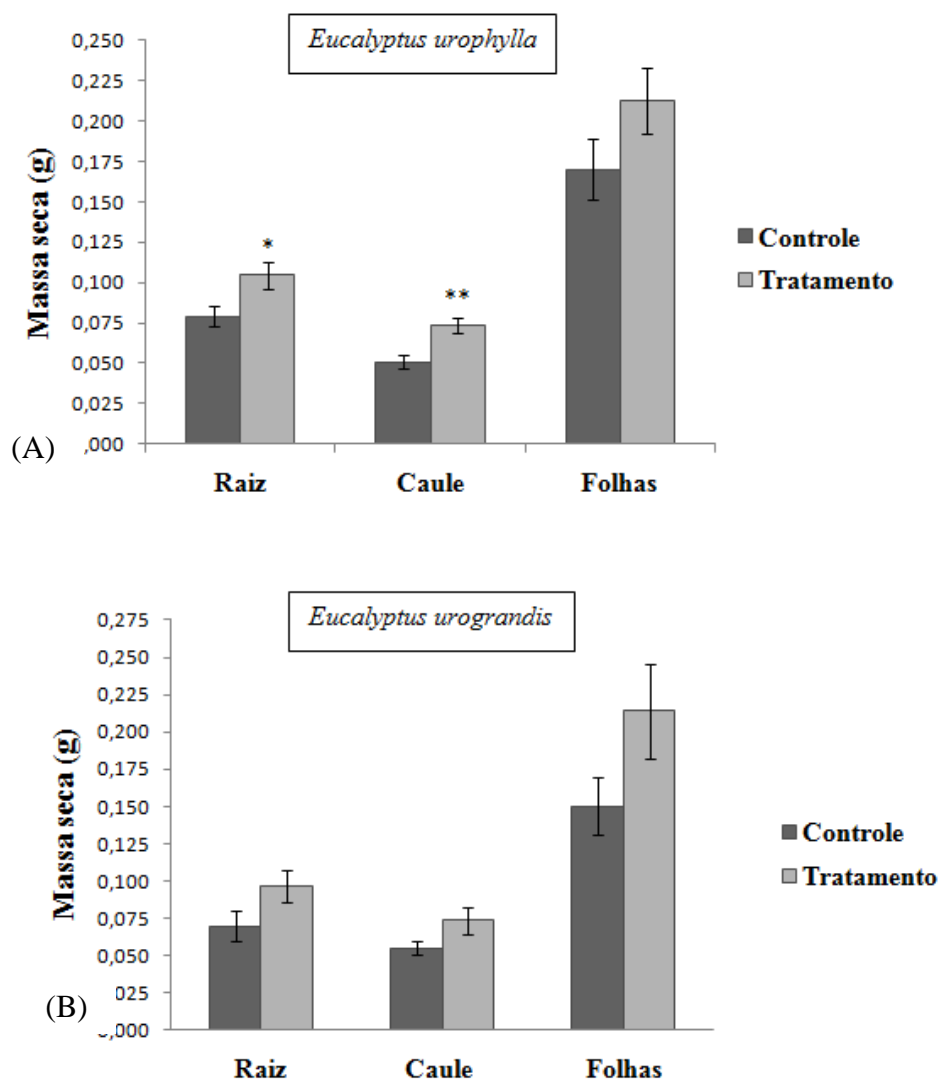


Fig. 4: Massa seca de raiz, caule e folhas de estacas inoculadas com *B. octagenarum* (tratamento), e não-inoculadas (controle). A. *E. urophylla*. B. *E. urograndis*. Efeito significativo a \*  $P \leq 0,05$  e \*\*  $P \leq 0,01$ , teste de Tukey. Barras representam médias  $\pm$  erro padrão (n = 12).



Fig. 5: Raízes de *E. urophylla*. A. Estacas não-inoculadas (controle). B. Estacas inoculadas com *B. octagenarum*.

As médias do controle e do tratamento para a variável área foliar não apresentaram diferenças em ambas as espécies (Fig. 6).

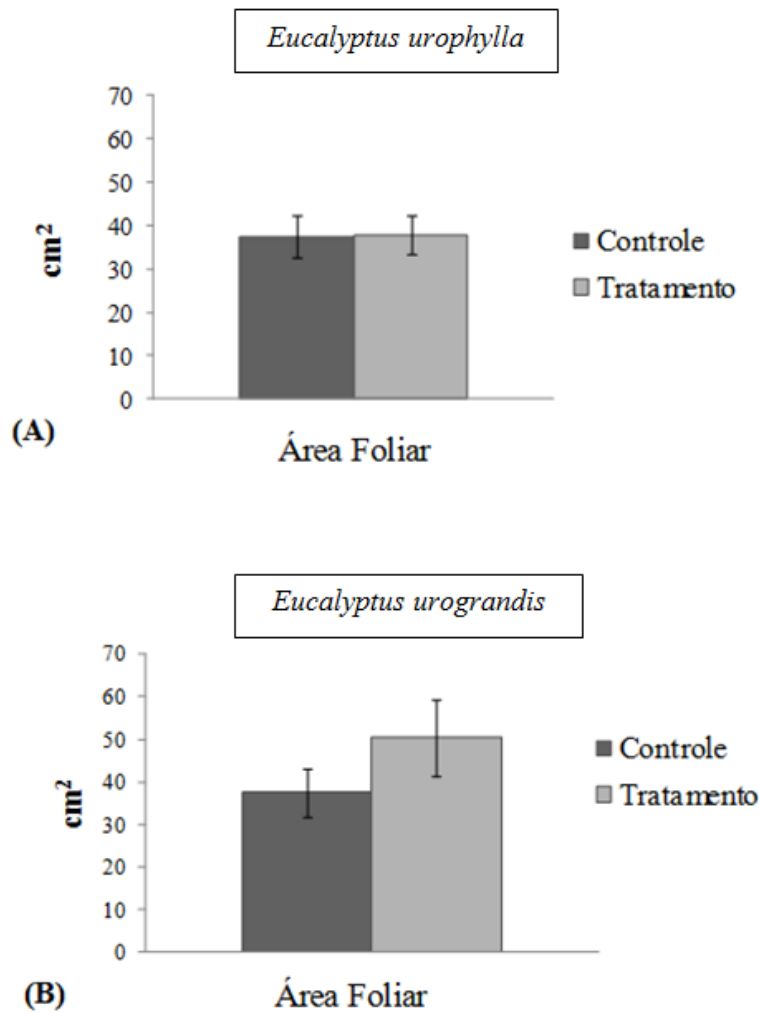


Fig. 6: Área foliar de estacas inoculadas com *B. octagenarum* (tratamento) e não-inoculadas (controle). A. *E. urophylla*. B. *E. urograndis*. Efeito significativo a \*  $P \leq 0,05$  e \*\*  $P \leq 0,01$ , teste de Tukey. Barras representam médias  $\pm$  erro padrão (n = 12).

A variável altura do caule, em estacas inoculadas, apresentou média estatisticamente igual ao valor obtido no controle, em ambas as espécies (Fig. 7).

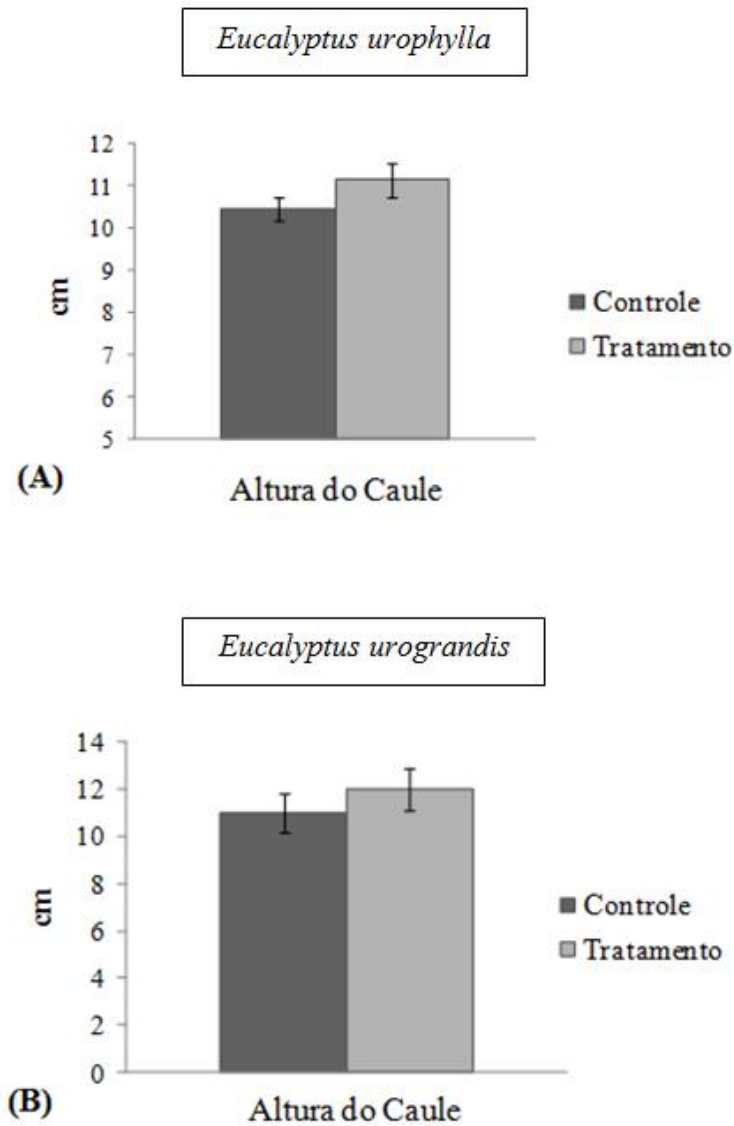


Fig. 7: Altura do caule de estacas inoculadas com *B. octagenarum* (tratamento) e não-inoculadas (controle). A. *E. urophylla*. B. *E. urograndis*. Efeito significativo a \*  $P \leq 0,05$  e \*\*  $P \leq 0,01$ , teste de Tukey. Barras representam médias  $\pm$  erro padrão (n=12).

### 3.2.3. Quantificação de colonização

Foi obtida a média equivalente a  $63,35 \mu\text{g cm}^{-2}$  de massa seca de colônias da cianobactéria, no decorrer de 45 dias de experimento, após a inoculação, calculada em relação à área foliar das estacas inoculadas na espécie *E. urophylla* e de  $50,64 \mu\text{g cm}^{-2}$ , para a espécie *E. urograndis*.

### 3.3. Identificação das substâncias bioativas

Os espectros obtidos a partir da análise realizada em LC-MS/MS revelaram a presença do ácido indol-3-acético em extrato de células de *B. octagenarum* (Fig. 8, B). Os fragmentos de massa do AIA (padrão), apresentaram picos de  $m/z$  158 e 130, referente à perda de água e do grupo carboxila, respectivamente. No extrato de células da cianobactéria, a fragmentação foi correspondente aos fragmentos obtidos no padrão, obtendo-se ainda o pico de  $m/z$  116, referente ao anel indólico.



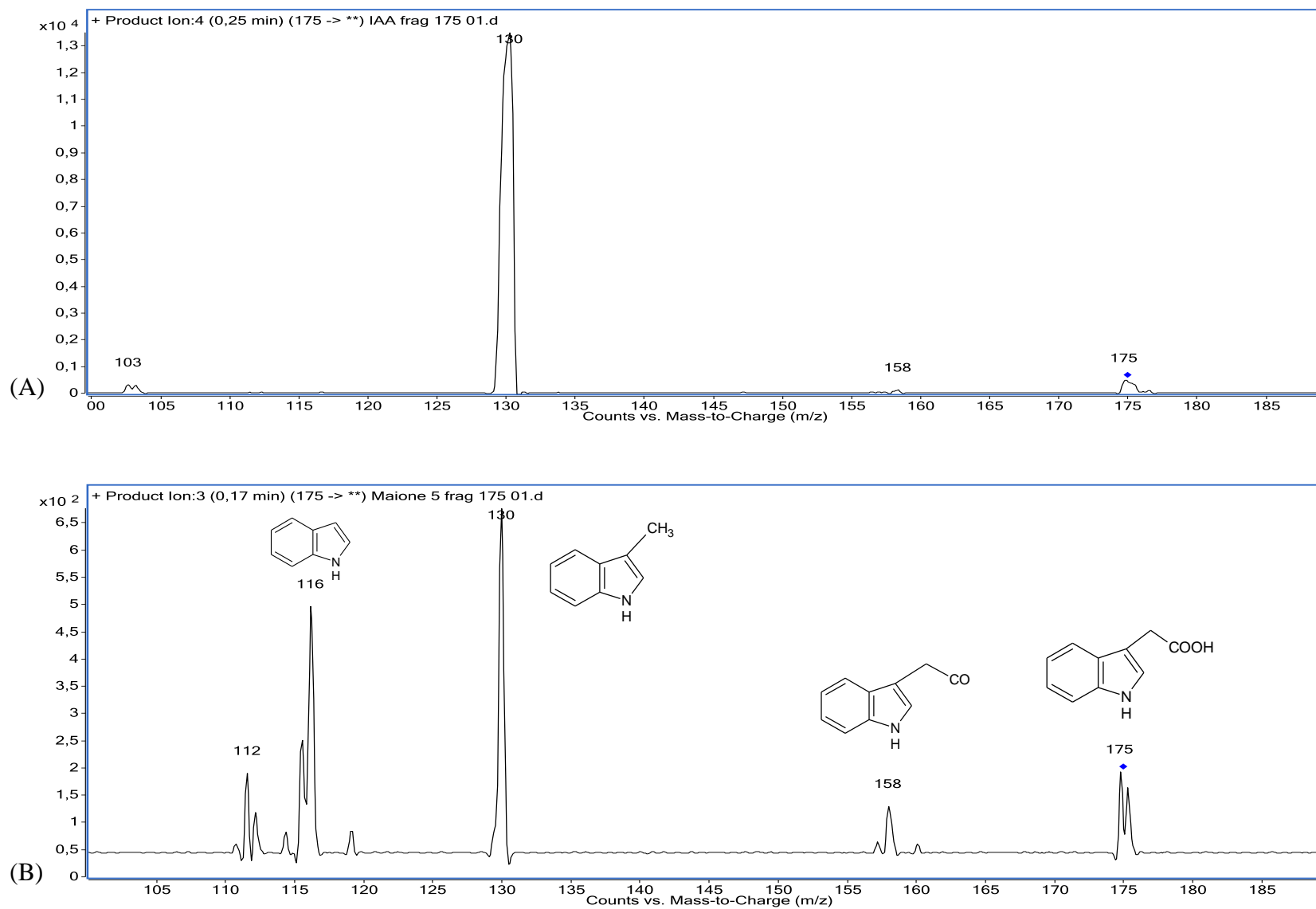


Fig. 8: Espectro dos fragmentos de massa, utilizando-se LC-MS/MS. A. Padrão ácido indol-3-acético. B. Extrato de células de *B. octogenerum*.

#### 4. DISCUSSÃO

O bioensaio de avaliação do crescimento do sistema radicular de sementes de alface mostrou que os produtos extracelulares produzidos pelas células de *B. octagenarum* foram capazes de estimular o crescimento da radícula, descartando-se a possível influência do meio BG-11, visto que, os resultados deste tratamento foram similares aos do controle. O tratamento com o meio de cultivo BG-11 foi realizado para avaliar a influência dos nutrientes, presentes na solução, contendo os PEC, sobre o crescimento do sistema radicular. Porém, não houve diferença significativa entre os tratamentos BG-11 e água desionizada, sendo os resultados de ambos, claramente inferiores aos tratamentos com PEC. Portanto, o crescimento da radícula da semente de alface ocorreu em resposta às substâncias orgânicas, presentes no tratamento com PEC, as quais exerceram efeitos similares aos das auxinas.

O tratamento PEC autoclavado foi realizado com o intuito de verificar se as substâncias ativas eram resistentes à degradação sob calor (120 °C) e pressão (1,5 atm). Os resultados mostraram que os dois tratamentos, PEC autoclavado e PEC não-autoclavado, exerceram efeitos estatisticamente iguais. Desta forma, pode-se afirmar que os produtos celulares produzidos por *B. octagenarum*, exerceram efeito positivo no crescimento das radículas e foram resistentes à degradação pelo processo de autoclavagem, assim como o são as auxinas.

Vários pesquisadores demonstraram que os produtos extracelulares de cianobactérias são capazes de estimular o desenvolvimento vegetal em culturas de tecidos (Molnár & Ördög, 2005; Zaccaro et al., 2006; Manickavelu et al., 2006; Shrivastava & Banerjee, 2009) e atribuíram este efeito à presença de reguladores do crescimento vegetal.

Stirk et al. (1999) identificaram a citocinina isopenteniladenina em *Arthronema africanum* (Cyanophyta, Oscillatoriales). Sergeeva et al. (2002) confirmaram a produção de compostos indólicos, liberados pelas cianobactérias, através de testes onde utilizaram o reagente de Salkowski. Estes pesquisadores investigaram 34 linhagens de cianobactérias. Destas, 16 eram de vida livre, com representantes de várias ordens, e 18 eram linhagens simbiotes pertencentes ao gênero *Nostoc*. Entre as linhagens de

cianobactérias de vida livre, 38% produziam ácido indol-3-acético (AIA) e, entre as simbiontes, 83%. Também foi confirmada a ocorrência de genes, em linhagens do gênero *Nostoc*, com regiões homólogas aos aqueles que codificam para a enzima descarboxilase do indol-3-piruvato, chave da via biossintética do AIA.

No presente estudo, foi identificado, no extrato de células de *B. octagenarum*, a presença do ácido indol-3-acético, com massa molecular de 175 Da. Comparando-se o espectro obtido dos fragmentos de massa do AIA, utilizado como padrão, observaram-se os mesmos picos no espectro obtido da fragmentação dos íons presentes no extrato de células de *B. octagenarum*.

Foi observado que a aplicação de células de *B. octagenarum* sobre mini-estacas de *E. urophylla* estimulou o crescimento do sistema radicular. Dentre os fatores envolvidos no enraizamento de estacas, a atividade da auxina parece exercer um papel central, que é o resultado final da regulação do seu metabolismo em conjunto com a sensibilidade das células vegetais ao fitormônio (Assis et al., 2003). Algumas das evidências amplamente comprovadas do papel das auxinas no enraizamento são: 1) Auxinas aumentam, consistentemente, a formação de raízes em estacas (Kesari et al., 2009; Saxena et al., 2000); 2) a presença de gemas e folhas jovens (fontes de auxinas), freqüentemente, aumentam o enraizamento de estacas (Middleton et al., 1980); 3) inibidores do transporte de auxinas podem bloquear a regeneração de raízes (Visser et al., 1996).

A colonização da parte aérea das plantas de *Eucalyptus* (obtidas do estaqueamento) ocorreu em pontos dispersos, principalmente, na superfície adaxial das folhas. Neste estágio, a área colonizada foi pequena e, portanto, não ocasionou redução da área total fotossinteticamente ativa. Ademais, devido à reduzida dimensão das colônias formadas, a disponibilidade de luz não chegou a ser afetada, mesmo nas áreas das folhas não colonizadas. Este fato foi confirmado através dos resultados obtidos para a quantificação de pigmentos foliares, em que não foram constatadas diferenças entre tratamento e controle.

Devido à presença do AIA no extrato de células de *B. octagenarum*, sugere-se, baseado nos resultados com o bioensaio, que esta auxina esteja sendo liberada no meio e que, possivelmente, tenha sido absorvida pelos tecidos das estacas de plantas inoculadas,

em especial, pelo limbo foliar, ocasionando o estímulo no crescimento, principalmente, do caule e do sistema radicular das plantas.

Ficou demonstrado que as células de *B. octagenarum* produzem fitorreguladores do crescimento vegetal e, por essa razão, essa cianobactéria possui potencial para ser utilizada no desenvolvimento de técnicas de propagação vegetativa em culturas de eucalipto, como fonte natural de AIA.

## 5. REFERÊNCIAS

Allen M. M. (1973) Methods for cyanophyceae. *Handbook of Phycological Methods, Culture Methods and Growth Measurements* (STEIN J.K., ed.), pp. 127-138. Cambridge University Press, New York, NY.

Aguiar R., Fiore M. F., Franco M. W., Ventrella M. C., Lorenzi A. S., Vanetti C. A. & Alfenas, A. C. (2008) A novel epiphytic cyanobacterial species from the genus *Brasilonema* causing damage to *Eucalyptus* leaves. *J. Phycol.* 44, 1322–1334.

Assis T. F., Fett-Neto A. G. & Alfenas A. C. (2004) Current techniques and prospects for the clonal propagation of hardwoods with emphasis on *Eucalyptus*. *Plantation Forest Biotechnology for the 21st Century* (Walter C. & Carson M., eds), pp. 303-333.

Berman-Frank I., Lundgren P. & Falkowski P. (2003) Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. *Res. Microbiol.* 154, 157-164.

Chauhan K. L. & Gupta A. B. (1984) Cytokinin-like substances in Blue-green algae. *Curr. Sci.* 3 (6), 324-325.

Cooper W. C. (1936) Transport of root-forming hormone in woody cuttings. *Plant Physiol.* 11 (4) 779–793.

De Klerk G. J., Van der Krieken W., De Jong J.C. (1999). The formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 35:189-199.

Devi B. P., Vimala A., Sai I. & Chandra S. (2008) Effect of cyanobacterial elicitor on neem cell suspension cultures. *Indian J.Sci.Technol.* 1 (7), 1-5.

Fogaça C. M. & Fett-Neto A. G. Role of auxin and its modulators in the adventitious rooting of *Eucalyptus* species differing in recalcitrance. *Plant Growth Regul.* (2005) 45: 1–10.

- Freitas T. A. S. de, Barroso D. G., Carneiro J. G. de A., Penchel R. M., Lamônica K. R., Ferreira D. (2005) Desempenho radicular de mudas de eucalipto produzidas em diferentes recipientes e substratos. *Rev. Árvore* 29, 853-861.
- Haroun S. A. & Hussein M. H. (2003) The promotive effect of algal biofertilizers on growth, protein pattern and some metabolic activities of *Lupinus termis* plants grown in siliceous soil. *A. J. Plant Sci.* 2 (13), 944-951.
- Lana R. M. Q., Lana Â. M. Q., Barreira S., Morais T. R. & Faria M. V. (2008) Doses do ácido indolbutírico no enraizamento e crescimento de estacas de eucalipto (*Eucalyptus urophylla*). *Biosci. J.*, 24 (3), 13-18.
- Kesari V., Krishnamachari A. & Rangan L. (2009) Effect of auxins on adventitious rooting from stem cuttings of candidate plus tree *Pongamia pinnata* (L.), a potential biodiesel plant. *Trees* 23, 597-604
- Middleton W., Jarvis B. C. & Booth A. (1980) The role of leaves in auxin and boron-dependent rooting of stem cuttings of *Phaseolus aureus* Roxb. *New Phytol.* 84, 251-259.
- Manickavelu A., Nadarajan N., Ganesh S.K., Ramalingam R., Raguraman S. & Gnanamalar R. P. (2006) Organogenesis induction in rice callus by cyanobacterial extracellular product. *Afr. J. Biotechnol.* (5), 437-439.
- Molnár Z. & Ördög V. Microalgal and cyanobacterial extracts in the tissue cultures of higher plants (pea, tobacco, beet) (2005) *Acta Biol. Szeged.* 49 (1-2), 39-40.
- Roger P. A. & Kulasooriya S. A. (1980) *Blue-green algae and Rice*. The international Rice Institute. Manila.
- Roger P. A., Zimmerman W. J., Lumpkin T. A. (1993) Microbiological management of wetland rice fields. (Metting B. F., ed), pp 417-455. *Soil microbial ecology: applications in agricultural and environmental management*. Marcel Dekker, New York.
- Saxena C., Samantaray S., Rout G. R. & Das P. (2000) Effect of auxin on in vitro rooting of *Plumbago zeylanica*: peroxidase activity as a marker for root induction. *Biol. Plantarum* 43 (1) 121-124.
- Sergeeva E., Liaimer A. & Bergman B. (2002) Evidence for production of the phytohormone indole-3-acetic acid by cyanobacteria. *Planta* 215, 229-238.
- Shrivastava S. & Banerjee M. (2009) Algal filtrate: a low cost substitute to synthetic growth regulators for direct organogenesis of embryo culture in *Jatropha curcas* (Ratanjyot). *Acta Physiol. Plant* 31, 1205-1212.
- Stirk W. A., Ördög V. & Staden van J. (1999) Identification of the cytokinin isopentenyladenine in a strain of *Arthronema africanum* (cyanobacteria). *J. Phycol.* 35, 89-92.

Skulberg O. M. (2000) Microalgae as a source of bioactive molecules – experience from cyanophyte research. *J. Appl. Phycol.* 12, 341–348.

Titon M., Xavier , Otoni W. C. & Reis, G. G. (2003). Efeito do AIB no enraizamento de miniestacas e microestacas de clones de *Eucalyptus grandis* w. Hill ex maiden. *R. Árvore* 27(1) 1-7.

Vaishampayan A., Sinha R. P., Hader D. P . L., Dey T., Gupta A. K., Bhan., U & Rao A. L. (2001) Cyanobacterial biofertilizers in rice agriculture. *The Botanical Review.* 67 (4), 453-516.

Visser J. W., Cohen V. J. D., Barendse C. W. M., Blom C. W. P. M., & Voesenek L. A. C. J. (1996) An Ethylene-mediated increase in sensitivity to auxin induces adventitious root formation in flooded *Rumex pahstris* Sm. *Plant Physiol.* 112, 1687-1692.

Wake H., Akasaka A., Umetsu H., Ozeki Y., Shimomura K. & Matsunaga T. (1992) Promotion of plantlet formation from somatic embryos of carrot treated with a high molecular weight extract from a marine cyanobacterium. *Plant Cell Rep.* 11, 62-65.

Welburn A. R. (1994). The spectral determination chlorophyll *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvent with spectrophotometers different of resolutions. *J.Plant Physiol.*144, 307-313.

Zaccaro M. C., Kato A., Zulpa G., Storni M. M., Steyerthal N. & Lobasso K. (2006) Bioactivity of *Scytonema hofmanni* (Cyanobacteria) in *Lilium alexandrae* *in vitro* propagation. *E. J. B.* (3), 210-214.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cianobactéria, subaerofítica, *B. octagenarum* UFV-E1 se desenvolve sobre o limbo foliar, colonizando plantas de *Eucalyptus* spp. em uma relação de epifitismo, sem ocasionar danos ao vegetal, nos estágios iniciais do desenvolvimento das colônias, quando a área recoberta do limbo possui pequenas dimensões. Nesta situação, as plantas testadas tiveram seu crescimento estimulado, possivelmente, em resposta a presença do fitorregulador de crescimento (auxina), produzido pelas células de *B. octagenarum*.

Estas constatações estão diretamente relacionadas às condições em que as plantas foram avaliadas, nas quais não havia fatores limitantes ao crescimento. Diferentemente do que foi observado, em um primeiro estudo, no qual plantas jovens (mudas clonais) de *Eucalyptus urograndis* colonizadas por *B. octagenarum* foram avaliadas enquanto estavam sendo mantidas em condições de viveiro, por períodos longos. Este fato pode ter favorecido o estabelecimento/desenvolvimento das colônias, quando estas passaram a atuar como um fator de estresse, limitando a incidência de luz sobre o limbo, e comprometendo o balanço fonte-dreno.

A produção do ácido indol-3-acético, a auxina natural mais abundante, pela cianobactéria *B. octagenarum*, foi confirmada em LC-MS/MS, o que possivelmente estimulou o crescimento radicular em plantas jovens e em mini-estacas inoculadas, na parte aérea, com este micro-organismo.

Sugere-se que *B. octagenarum*, uma cianobactéria subaerofítica, recentemente descrita em viveiro clonal, possui potencial para ser utilizada no desenvolvimento de técnicas de propagação vegetativa, em cultura de eucalipto, onde poderá atuar como fonte de auxina natural, reduzindo custos e incrementando a produtividade vegetal.