



Eficiência de *Gluconacetobacter diazotrophicus* no aumento de prolina livre em arroz vermelho sob deficiência hídrica⁽¹⁾.

Renata Priscila Almeida Silva⁽²⁾; Luanna Maria Beserra Filgueiras⁽³⁾; Alberto Soares de Melo⁽⁴⁾; Marcia Soares Vidal⁽⁵⁾; José Ivo Baldani⁽⁶⁾; Carlos Henrique Salvino Gadêlha Meneses⁽⁷⁾.

⁽¹⁾ Trabalho executado com recursos do Chamada Pública MCTI/CNPq Nº 14/2013

⁽²⁾ Estudante do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias; Universidade Estadual da Paraíba; Campina Grande, PB; re.priscilaalmeida@hotmail.com; ⁽³⁾ Estudante do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias; Universidade Estadual da Paraíba; Campina Grande, PB; luannabeserra-uepb@hotmail.com; ⁽⁴⁾ Professor do Departamento de Biologia e do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias; Universidade Estadual da Paraíba; Campina Grande, PB; alberto@uepb.edu.br; ⁽⁵⁾ Pesquisador da EMBRAPA Agrobiologia; Seropédica; RJ; marcia.vidal@embrapa.br; ⁽⁶⁾ Pesquisador da EMBRAPA Agrobiologia; Seropédica; RJ; ivo.baldani@embrapa.br; ⁽⁷⁾ Professor do Departamento de Biologia e do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias; Universidade Estadual da Paraíba; Campina Grande, PB; carlos@ccaa.uepb.edu.br;

RESUMO: O cultivo de arroz vermelho (*Oryza sativa* L.) no Brasil, atualmente está restrito a pequenas áreas do semiárido nordestino, áreas de insuficiência hídrica, fator limitante para a produção vegetal por causar alterações no metabolismo das plantas, é necessária a tomada de medidas que amenizem tal efeito. Nesse sentido, a interação dessa cultura com bactérias endofíticas, promotoras de crescimento, como *Gluconacetobacter diazotrophicus*, surge como alternativa no aumento da tolerância ao estresse hídrico por esses microrganismos fornecerem substâncias que estariam pouco disponíveis, afetando diretamente o metabolismo da planta. De acordo com o exposto, este trabalho tem como objetivo quantificar os teores de prolina livre em plantas de arroz vermelho (genótipo 405 Embrapa Meio Norte) inoculadas com *G. diazotrophicus* sob deficiência hídrica na fase reprodutiva de desenvolvimento. Neste trabalho, plantas de arroz vermelho, com e sem inoculação com *G. diazotrophicus*, foram submetidas a quatro condições de umidade do solo: 30%, 50%, 70% e 100% da capacidade de campo, mais um tratamento controle (solo em capacidade de campo). Após o estabelecimento dos níveis de estresse, foram avaliados os teores de prolina livre, em plantas submetidas à deficiência hídrica. O genótipo 405 Embrapa Meio Norte de Arroz vermelho mostrou um alto teor de prolina livre, quando inoculado com *G. diazotrophicus*. Esse osmoprotetor mostrou ser eficiente na avaliação da indicação e recuperação de plantas de arroz vermelho submetidas ao estresse hídrico.

Termos de indexação: *Oryza sativa* L.; Solutos osmoprotetores; Resistência hídrica.

INTRODUÇÃO

O arroz vermelho (*Oryza sativa* L.), apesar de ser considerada uma planta daninha em algumas regiões do país, é bastante explorado na região Nordeste com ênfase na região do Vale do Piancó - PB e na Chapada do Apodí - RN, sendo também cultivado nos estados de Pernambuco e Ceará, onde há um grande déficit de pluviométrico anual (Pereira, 2004). O déficit hídrico afeta praticamente qualquer aspecto do crescimento das plantas, inclusive a anatomia, a morfologia a fisiologia e a bioquímica; a absorção e a translocação de água e nutrientes, induzindo, nas plantas, diversas modificações bioquímicas.

Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal (BPCV) são capazes de produzir compostos para nutrição e facilitar a absorção de nutrientes, bem como estimular o crescimento das plantas com fitormônios, resistência ambiental e atuarem como agentes de biocontrole. Bastian et al. (1998) verificaram que as bactérias *Herbaspirillum seropedicae* e *Gluconacetobacter diazotrophicus*, bactérias diazotróficas endofíticas produzem giberelinas e ácido indol acético, sendo possível explicar alguns efeitos benéficos destas bactérias dentro da planta.

Por meio de interações com microrganismos as plantas podem desenvolver mecanismos de adaptação às adversidades ambientais (Peixoto Neto et al., 2004). Dentre essas interações encontram-se aquelas relacionadas com os microrganismos denominados endofíticos, que podem produzir produtos de potencial interesse biotecnológico (Azevedo, 1998). Esses microrganismos utilizam diferentes mecanismos para promover o crescimento vegetal, como a produção de hormônios de crescimento vegetal, solubilização de nutrientes do solo, proteção contra patógenos e estresses abióticos, fixação de nitrogênio atmosférico, entre outros (Hayat et al., 2010).



Este trabalho teve como objetivo quantificar prolina livre em plantas de arroz vermelho inoculadas com *G. diazotrophicus* sob deficiência hídrica na fase vegetativa de desenvolvimento.

MATERIAL E MÉTODOS

Caracterização da área experimental

O experimento foi realizado no horto florestal e no ECOLAB, localizados no Campus I, Campina Grande-PB.

Tratamentos e amostragens

O experimento foi executado utilizando-se a cultura do arroz vermelho, constando de duas condições de inoculação com a bactéria endofítica *G. diazotrophicus* (I1= sementes não inoculadas e I2= sementes inoculadas), um genótipo (405 Embrapa Meio Norte) em plantas com diferentes condições de restrição hídrica, U1= 30%; U2= 50%; U3= 70% e U4= 100% da capacidade de campo. Logo após a coleta das amostras, todos os tratamentos foram reidratados, e após uma hora, uma nova coleta foi realizada. Utilizando delineamento inteiramente casualizados, em um fatorial 2x4, sendo 4 repetições com 8 tratamentos, onde cada parcela será constituída de um lisímetro de drenagem, e semeadas 70 sementes por lisímetro, após germinadas será feito um desbaste totalizando 60 plantas por parcela.

Quantificação dos teores de prolina livre

O teor de prolina será determinado utilizando-se o método de Bates et al. (1973). Para a realização do teste colorimétrico, pipetaram-se alíquotas de 1,0 mL do extrato bruto; 1,0 mL de ninhidrina ácida; 1,0 mL de ácido acético glacial. Após banho-maria fervente por 60 min., resfriaram-se os frascos e efetuou-se leitura do composto colorido a 520 nm. Como referência, será utilizada uma reta padrão com L-prolina.

Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste F, e comparando-se as médias por meio do Teste de Tukey a 1% de significância, utilizando-se do programa SIGMAPLOT.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise sobre o número de bactérias diazotróficas presentes nas raízes e folhas lavadas, avaliadas durante o estágio de desenvolvimento reprodutivo, mostrou a presença de bactérias

diazotróficas em todos os tratamentos inoculados, porém não sendo detectadas nos tratamentos controle (não inoculados) (**Tabela 1**). Em todos os tratamentos inoculados se verificaram concentrações de *G. diazotrophicus* PAL5 maiores que 10^5 UFC g⁻¹. Punschke et al. (2005), encontraram resultados similares quando quantificaram bactérias diazotróficas em duas variedades de arroz cultivadas no Uruguai, onde 69% das amostras de raízes apresentaram concentrações maiores que 10^5 UFC g⁻¹. Por outro lado, Sabino (2007) não encontrou diferença no número de células entre os tratamentos inoculados com *B. brasilense* e *H. seropedicae* e os não inoculados em plantas de arroz avaliadas nos estádios de florescimento e maturação de grãos.

Foi observada diferença na população de bactérias entre os tecidos de arroz vermelho coletados sob as condições testadas (**Tabela 1**). Rouws (2010) também não encontrou uma tendência definida a respeito do comportamento das estirpes *H. seropedicae* ZAE94, *S. azotifigens* e *S. trueperi* testadas durante o ciclo da cultivar de arroz BRS Talento. Experimentos de inoculação de arroz com e sem adubação nitrogenada mostraram que o número de bactérias diminuiu com a idade da planta, atingindo o equilíbrio no estágio de maturação, o que corresponde à fase final do ciclo da cultura (Ferreira, 2004).

Tabela 1 – Estimativa do número mais provável (Log do n° células g⁻¹) de *G. diazotrophicus* PAL5 presentes nas raízes e folhas de plantas de arroz vermelho. Coletadas nas fases de desenvolvimento vegetativo.

Tratamento	Meio de Cultura	Reprodutivo	
		Raízes	Folhas
Não Inoculado	LGI-P**	N.D.	N.D.
PAL5		5.44±0.24*	5.36±0.34*

*Média ± desvio padrão (n=3), **Meio LGI-P (semi seletivo para *Gluconacetobacter* spp.). N.D. (Não detectada).

Foi constatada uma diferença altamente significativa para as variáveis PRO(E), análise de prolina das plantas estressadas, quando analisados a 1% de probabilidade. Verificou-se, ainda, que as plantas inoculadas e não inoculadas após a reidratação não diferenciaram ($p \geq 0,05$), PRO(R), análise de prolina das plantas reidratadas, o mesmo aconteceu na interação.

Analisando a **figura 1**, nota-se que houve diferença significativa entre os tratamentos de estresse hídrico, 100%, 70%, 50% e 30%, em seus respectivos fatores, quando não inoculado e inoculado, nos teores de prolina. Por outro lado, não



se diferenciando entre si nos tratamentos de 100% e 70% da capacidade de campo para o arroz não inoculado. Observou-se também, que não houve diferença significativa entre os tratamentos após as plantas serem reidratadas (onde, foi feita uma coleta no momento de estresse, irrigou-se e após uma hora, novamente coletou amostras) mesmo quando inoculado e não inoculado.

Constatou-se ainda que, quando o arroz vermelho encontrava-se na situação de 100% de capacidade de campo não houve diferença significativa entre os fatores inoculado, não inoculado, inoculado hidratado e não inoculado hidratado. No entanto, houve diferença significativa entre os fatores inoculado, não inoculado, inoculado hidratado e não inoculado hidratado para 70% da capacidade de campo, havendo insignificância para não inoculado, não inoculado hidratado e inoculados hidratado (**Figura 1B**).

Estando a planta em 50% e 30% da capacidade de campo, verificou-se diferença entre inoculado e não inoculado, não inoculado hidratado e inoculado hidratado, não havendo diferença significativa entre inoculado hidratado e não inoculado hidratado (**Figura 1B**). Resultados semelhantes a estes foram encontrados por Dutra (2014) em pesquisa sobre ecofisiologia e alteração bioquímica do arroz vermelho sob níveis de água no solo e cultivo orgâmineral, verificou que a intensificação do nível de prolina quando se aplicou a menor lâmina de irrigação N1 (70%), ou seja, quando o arroz passou por um déficit hídrico maior, apresentando desta forma um efeito significativo no arroz vermelho em função dos níveis de água no solo (AD), resultando no acúmulo deste aminoácidos. Trabalhos como de Abdul Jaleel et al. (2007) estudando os efeitos da prolina no arroz constatou-se sua função osmoprotetora, como sendo um dos mecanismos adaptativos dos vegetais aos inúmeros efeitos causados pelos estresses abióticos, mantendo-se o equilíbrio hídrico e preservando a integridade celular de proteínas, enzimas e membranas.

O acúmulo de prolina em plantas representa uma importante resposta adaptativa a estresses abióticos, principalmente devido à sua propriedade osmoprotetora (Campos, 2009). Segundo Kavi Kishor et al. 2005, durante situações de seca e alta salinidade, o seu acúmulo reduz a osmolaridade da célula, promovendo o influxo de água, que por sua vez promove a manutenção do turgor necessário para a expansão celular e aumento da rigidez mecânica de células e tecidos. Neste caso, com o aumento do estresse hídrico, verificou-se aumento nos teores de prolina quando o arroz vermelho foi inoculado com a bactéria *G. diazotrophicus*, havendo um incremento de 32,9% e não inoculado de 18,8% (**Figura 1A**).

CONCLUSÕES

O arroz vermelho inoculado com *G. diazotrophicus* constitui-se numa potencial ferramenta para mitigação do estresse hídrico;

O parâmetro avaliado, teor de prolina livre, mostrou ser eficiente na avaliação da indicação e recuperação de plantas de arroz vermelho submetidas ao estresse hídrico.

REFERÊNCIAS

- ABDUL JALEEL, C.; MANIVANNAN, P.; KISHOREKUMAR, A.; SANKAR, B.; GOPI, R.; SOMASUNDARAM, R.; PANNEERSELVAM, R. Alterations in osmoregulations, antioxidant enzymes and indole alkaloid levels in *Catharanthus roseus* exposed to water deficit. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.59, p.150-157, 2007.
- AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. de. *Ecologia microbiana*. Jaguariuna: Embrapa-CNPMA, 1998, 486p.
- BATES, L.; WALDREN, R. P.; TEARE, I. D.; Rapid determination of free proline for water - stress studies. *Plant and Soil*, v.39, p.205-207, 1973.
- BASTIAN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. Production of indole-3-acetic and gibberelins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regulation*, v.24, p. 7-11, 1998.
- CAMPOS, V. B. Crescimento inicial do maracujazeiro amarelo em solo sódico com biofertilizante. Dissertação de Mestrado, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia, 52p. 2009.
- DUTRA, K.O.G. Ecofisiologia e alteração bioquímica do arroz vermelho sob níveis de água no solo e cultivo orgâmineral. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias)- Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, PB. 72p. 2014.
- FERREIRA, J. S. Seleção e avaliação de veículos para inoculação de bactérias diazotróficas na cultura do arroz inundado. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Ciência do solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 44p. 2004.
- HAYAT, R.; ALI, S.; AMARA, U.; KHALID, R.; AHMED, I. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology*, v.60, p.579-598, 2010.
- KAVI KISHOR, P. B.; HONG, Z.; MIAO, G. H.; HU, C. A. A.; VERMA, D. P. S. Overexpression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiology*, v.108, p.1387–1394, 1995.



PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; CAETANO, L. C. Microrganismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. Boletim Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, v.3, n.4, p.69-72, 2004.

PEREIRA, J. A. O arroz-vermelho cultivado no Brasil. Teresina; Embrapa Meio-Norte, 2004.

PUNSCHKE, K.; CARLO-MAGNO, M.; LA BANDERA, C. Potencial agronômico de bactérias fijadoras de nitrógeno endófitas de arroz. In: V Simposio de Recursos Genéticos para América Latina y el Caribe: Actas Uruguay, 2005.

ROUWS, L.F.M.; MENESES, C.H.S.G.; GUEDES, H.V.; VIDAL, M.S.; BALDANI J.I.; SCHWAB S. Monitoring the colonization of sugarcane and rice plants by the endophytic diazotrophic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* marked with *gfp* and *gusA* reporter genes. Letters in Applied Microbiology, v.51, p. 325–330, 2010.

SABINO, Daniele Cristina Costa. Interação planta-bactéria diazotrófica na cultura do arroz. Tese (Doutorado em Agronomia – Ciência do solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 71p. 2007.

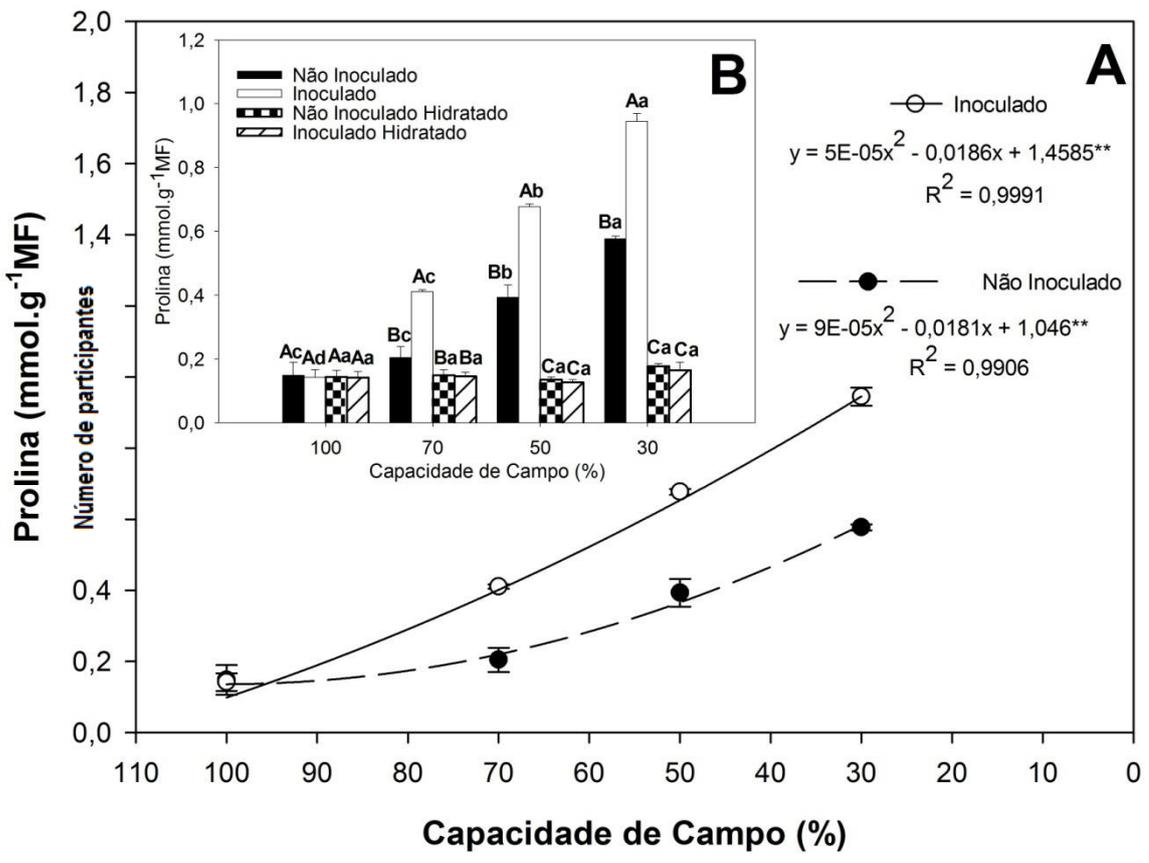


Figura 1 – Teores de prolina livre em folhas de arroz vermelho sob estresse de 15 dias e reidratação (1 hora).