

# UTILIZAÇÃO DA BACTÉRIA *Rhodococcus fascians* NA OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE FORMAÇÃO DE BROTOS DE ACÁCIA NEGRA

## USE OF THE BACTERIUM *Rhodococcus fascians* FOR OPTIMIZATION OF BLACK WATTLE SHOOT FORMATION

Cristiane De LOYOLA EISFELD<sup>1</sup>  
Luciana LOPES FORTES RIBAS<sup>2</sup>  
Marguerite QUOIRIN<sup>3</sup>

### RESUMO

A acácia negra (*Acacia mearnsii*) é cultivada por pequenos produtores na região Sul do Brasil. Esta espécie produz madeira, celulose e taninos. Devido a essa importância, é preciso estabelecer técnicas de propagação desta espécie em grande escala. Uma técnica que pode possibilitar a formação de brotos múltiplos consiste em utilizar a bactéria *Rhodococcus fascians*. Quando plântulas de acácia negra germinadas *in vitro* são infectadas, no lugar do ápice se desenvolvem galhas formadas por centros meristemáticos múltiplos e primórdios de gemas. Para favorecer o alongamento dessas gemas, galhas foram separadas das plântulas e cultivadas em meio de MURASHIGE e SKOOG (1962) contendo  $\frac{3}{4}$  da concentração dos sais, 20 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 7 g.L<sup>-1</sup> de ágar. Três experimentos foram realizados. No primeiro foi testada a adição ou não de carvão ativado (CA) (2 g.L<sup>-1</sup>); no segundo foram testadas a ausência e três concentrações (0,29; 1,44 e 2,89 µM) de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) e no terceiro a ausência e três concentrações (1,0; 2,0 e 5,0 µM) de ácido 2,3,5-triidobenzóico (TIBA). A adição de CA no meio de cultura não aumentou a formação de brotos, porém inibiu a indução de raízes. Já no segundo experimento, a suplementação de 1,44 µM de GA<sub>3</sub> ao meio de cultura provocou a formação de um maior, porém não significativo, número médio de brotos por galha. No terceiro experimento, foi possível observar que as concentrações de 2 e 5 µM de TIBA possibilitaram uma formação de brotos significativamente maior que o meio de cultura desprovido de TIBA.

**Palavras-chave:** *Acacia mearnsii*, árvore leguminosa, cultura *in vitro*, organogênese.

### ABSTRACT

Black wattle (*Acacia mearnsii*) is planted by small farmers in South of Brazil. This species provides cellulose, paper and tannin. Considering the economical importance of black wattle, clonal propagation techniques need to be assessed. The technique described in the present work uses the bacterium *Rhodococcus fascians* to induce the formation of multiple shoots. When *in vitro* germinated black wattle plantlets are infected with *R. fascians*, leafy galls consisting of multiple meristems and bud primordia develop at apical buds. In order to induce the formation of shoots, leafy galls were excised from the plantlets and cultured in culture media containing three-fourth of mineral salts of MURASHIGE and SKOOG (1962) [8] medium (MS), full MS vitamins and organic compounds, 20 g.L<sup>-1</sup> sucrose and 7 g.L<sup>-1</sup> agar. Three experiments were conducted. In the first one, activated charcoal (AC) was added (2g.L<sup>-1</sup>) or not to the culture medium. In the second one, three concentrations (0.29; 1.44 e 2.89 mM) of gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) were tested and compared to a control without GA<sub>3</sub>. In the third one three concentrations (1.0; 2.0 e 5.0 mM) of 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA) were supplemented to the culture medium. There was no statistical difference between shoot formation on AC containing media and control media. In the second experiment, it was observed that addition of 1,44 mM GA<sub>3</sub> to the culture medium induced a higher, but not significant, mean number of shoots. When 2 or 5 mM of TIBA was added to the culture media, the number of shoots per leafy gall was 2.91 and 2.48 respectively, higher than on control medium (1.48).

**Key-words:** black wattle, organogenesis, *in vitro* tissue culture, leguminous tree.

<sup>1</sup>Acadêmica do Curso de Engenharia Florestal da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Bolsista PIBIC-CNPq.

<sup>2</sup>Bióloga, Doutor, Professor, Departamento de Botânica, UFPR. Caixa postal 19031, CEP 81530-900 Curitiba, PR. Ifribas@ufpr.br. Autor para correspondência.

<sup>3</sup>Engenheira Agrônoma, Doutor, Professor, Departamento de Botânica, UFPR.

## INTRODUÇÃO

*Acacia mearnsii*, popularmente conhecida como acácia negra, pertence à família Fabaceae, subfamília Mimosoideae. Esta espécie, originária do Sudeste da Austrália, vive nos mais variados ambientes, sendo mais abundante em regiões tropicais (1). No Brasil, é cultivada por pequenos produtores na região Sul. Fornece madeira e celulose, enquanto que sua casca é utilizada para produção de taninos destinados à indústria do curtume, à medicina e outras aplicações (13). Devido à importância da acácia negra, é preciso estabelecer técnicas de propagação em grande escala e fornecer material para programas de reflorestamento. A micropropagação da acácia negra ainda é problemática. Pela técnica de multiplicação de gemas axilares, Quoirin *et al.* (10) obtiveram taxas de multiplicação de 1,7 a 3 por mês, as quais são consideradas como baixas para realizar uma micropropagação eficiente. Outra técnica estudada foi a utilização da bactéria *Rhodococcus fascians* para induzir a formação de brotos múltiplos. Esta bactéria gram-positiva infecta uma grande variedade de plantas dicotiledôneas e monocotiledôneas (5). A indução da fasciação está relacionada com a presença de um plasmídeo linear de 185 kb, chamado pFiD188, que carrega loci envolvidos na formação da galha (4, 2, 3, 15). A mutação no locus *att* induz uma fasciação atenuada, produzindo pequenas galhas. Este locus é muito importante para a regulação da expressão dos genes de virulência da bactéria (6). A mutação no locus *hyp* provoca uma hiperfasciação, quando comparada com um tipo selvagem de bactéria (3). A acácia negra, quando infectada pela bactéria, desenvolve galhas no lugar do ápice (11). Estas são formadas por centros meristemáticos múltiplos e primórdios de brotos que não se alongam. O presente estudo teve como objetivo desenvolver a etapa de formação de brotos a partir das galhas de *Acacia mearnsii* cultivadas *in vitro*, comparando diferentes concentrações e tipos de fitorreguladores para aumentar a quantidade de brotos por galha.

## MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de acácia negra, obtidas da empresa Tanagro (RS), foram escarificadas por fervura em água destilada (1 min), desinfestadas por imersão em hipoclorito de sódio 5% (15 min) e enxaguadas em água destilada estéril por três vezes. Em seguida, foram inoculadas em frascos de vidro (250 ml de capacidade) autoclavados contendo algodão embebido com água destilada. As sementes foram mantidas por 7 dias em sala de crescimento, a  $26 \pm 3^\circ \text{C}$ , sob luz fluorescente de tipo "luz do dia", densidade de fluxo de fótons de aproximadamente  $40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 h.

A bactéria *Rhodococcus fascians*, fornecida pelo Laboratoire de Biotechnologie Végétale, Université Libre de Bruxelles, Bélgica, foi cultivada em meio Yeast Extract Broth (YEB) solidificado com ágar ( $15 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) por 24 h. Em seguida, ela foi inoculada em meio YEB líquido mantido sob agitação a  $28^\circ \text{C}$  por 24 horas.

Plântulas de 7 dias foram imersas na solução de bactéria e mantidas sob vácuo por 10 min. Elas foram então transferidas a frascos contendo 40 ml de meio de cultura de Murashige e Skoog (9) isento de fitorreguladores (MS0), adicionado de  $1 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  de sacarose e solidificado com ágar ( $7 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), mantidas por sete semanas em cultivo.

Galhas excisadas logo abaixo do nó cotiledonar foram fonte de explantes para três tipos de experimentos. Elas foram cultivadas no meio de cultura basal MS<sup>3/4</sup> (meio de cultura MS com 3/4 da concentração de sais, Quoirin *et al.*, 2004), vitaminas e compostos orgânicos do mesmo meio,  $20 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  de sacarose e  $7 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  de ágar. A este meio foi também adicionado o antibiótico cefotaxima ( $250 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), para matar *Rhodococcus fascians* e promover a emissão de brotos. Os experimentos a seguir foram desenvolvidos:

- 1) avaliação do efeito da adição ou não de carvão ativado ( $2 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )
- 2) uso de diferentes níveis de GA<sub>3</sub> (0; 0,29; 1,44 e  $2,89 \mu\text{M}$ )
- 3) uso de diferentes níveis de ácido 2,3,5-triidobenzóico (TIBA) (0; 1,0; 2,0 e  $5,0 \mu\text{M}$ ).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Cada unidade experimental foi constituída por cinco frascos contendo 5 galhas por frasco e 4 repetições.

Os frascos contendo as galhas foram mantidos em sala de crescimento por 30 dias, até a primeira avaliação, quando foi observada a formação de brotos e/ou raízes a partir das galhas. Foi calculado a percentagem de galhas com brotos e a percentagem de galhas com raízes. Após 60 dias foi realizada a segunda avaliação, tendo por objetivo determinar a quantidade de brotos desenvolvidos por galha.

Os dados médios e originais foram submetidos a análise de variância e ao teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A presença de  $2 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  de carvão ativo não revelou diferença significativa ( $P < 0,05$ ) na formação de brotos a partir das galhas após 60 dias em cultivo (Tabela 1). Por outro lado, a ausência de CA resultou em maior e significativa ( $P < 0,05$ ) percentagem média de galhas enraizadas. Este resultado pode indicar que ocorreu uma adsorção das auxinas da galha pelo CA, uma vez que o meio de cultura não continha

fitoreguladores. Quoirin *et al.* (10) indicaram que a presença do carvão ativado no meio induz um

aumento do alongamento dos brotos de *A. mearnsii* cultivados *in vitro* e não inoculados com a bactéria.

TABELA 1 – Formação de brotos e raízes em galhas de *Acacia mearnsii* cultivadas em meio MS<sup>3/4</sup> contendo ou não carvão ativado (2 g.L<sup>-1</sup>), após 30 e 60 dias em cultivo.

Tratamentos	% de galhas com brotos		Nº médio de brotos por galha após 60 dias	% de galhas com raízes após 60 dias
	Após 30 dias	Após 60 dias		
sem CA	45,7a	66,1a	1,4a	73,2a
com CA	36,4a	66,1a	1,5a	40,7b

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A formação da galha após a infecção por *R. fascians* é devida a uma alteração do balanço hormonal (auxinas/citocininas) da planta hospedeira, mas a natureza exata das moléculas sinalizadoras não é totalmente conhecida (5). Manes *et al.* (7) mostraram que, nos tecidos do tabaco infectados com *R. fascians*, os níveis de citocininas e seus derivados são baixos demais para serem significativos. No entanto, os níveis de ácido indolacético foram mais elevados que nos tecidos correspondentes não inoculados.

No segundo experimento, o uso de GA<sub>3</sub> no meio de cultura não resultou em diferenças significativas, tanto para percentagem de galhas com brotos, quanto para número de brotos por galha e percentagem de galhas com raízes (Tabela 2).

O efeito das giberelinas sobre a elongação

dos entrenos é bem conhecido (12). Porém, na cultura de gemas de pêra japonesa (*Pyrus serotina*), Yotsuya *et al.* (16) observaram um resultado diferente: o GA<sub>3</sub> (2,89 µM), adicionado ao meio de cultura contendo 4,4 µM de benziladenina, não teve efeito sobre o alongamento dos brotos, enquanto que a mistura de GA<sub>4</sub> e GA<sub>7</sub> estimulou o alongamento.

Em plantas de tabaco infectadas com *R. fascians*, a aplicação de giberelinas não afetou a formação da galha enquanto que, no caso da ervilha, a giberelina impediu esta formação (5). Porém, não existe publicação de trabalho testando a aplicação deste fitoregulador na galha já formada. No presente trabalho, GA<sub>3</sub> foi testado no intuito de provocar o alongamento dos brotos a partir das gemas formadas na galha.

TABELA 2 – Formação de brotos e raízes em galhas de *Acacia mearnsii* cultivadas 30 e 60 dias em meio MS<sup>3/4</sup> contendo ou não ácido giberélico.

Concentração de GA <sub>3</sub>	% de galhas com brotos		Nº médio de brotos/galha após 60 dias	% de galhas com raízes após 60 dias
	Após 30 dias	Após 60 dias		
0	38,4a	55,5a	1,4a	50,0a
0,29 µM	53,7a	64,2a	1,5a	61,7a
1,44 µM	54,2a	68,3a	1,5a	52,5a
2,89 µM	59,5a	66,7a	1,4a	49,5a

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No terceiro experimento, a suplementação de TIBA ao meio de cultura resultou em maiores e significativas percentagens de formação de brotos e raízes e maior número médio de brotos por galha (Tabela 3). Neste experimento foi observado um provável efeito anti-auxínico do TIBA quando comparado com a ausência. O uso de 2 µM de TIBA resultou no maior número médio de brotos por galha (2,9) e a maior percentagem na formação de brotos

(92,0%) foi obtida com 5 µM.

No presente trabalho, o TIBA parece atuar como inibidor do transporte da auxina, facilitando o desenvolvimento de brotações a partir das gemas da galha e dificultando a formação de raízes. Segundo Schell *et al.* (14), o TIBA atua inibindo o transporte polar da auxina de maneira não competitiva, ligando-se ao carregador de efluxo de ânions situado na base da célula. Tal fixação modifica a conformação do

carregador e impede a sua translocação através do plasmalema e modifica o balanço hormonal, de tal maneira que reduz a rizogênese. De outro lado, McKay *et al.* (8) indicaram que o TIBA, além do efeito sobre o transporte polar das auxinas, pode também atuar

como uma auxina fraca.

Os brotos obtidos foram de boa qualidade (Figuras 1 e 2); foram divididos em micro-estacas, de maneira a aumentar a quantidade de material vegetal.

TABELA 3 – Formação de brotos e raízes em galhas de *Acacia mearnsii* cultivadas em meio MS¼ contendo ou não ácido 2,3,5-triidobenzóico, após 30 e 60 dias de cultivo.

Concentração de TIBA	% de galhas com brotos		Nº médio de brotos por galha após 60 dias	% de galhas com raízes após 60 dias
	Após 30 dias	Após 60 dias		
0	44,0a	57,3a	1,5a	69,3a
1,0 µM	52,0a	82,7b	2,2b	20,0b
2,0 µM	58,7a	85,3b	2,9c	13,3b
5,0 µM	50,7a	92,0b	2,5bc	5,3b

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## CONCLUSÃO

Este trabalho mostra que o uso do TIBA no meio de cultura aumenta o número médio de brotos a partir das galhas induzidas por *Rhodococcus fascians*. No entanto, a presença de 0,2% de carvão ativado (CA) nos meios de cultura não tem efeito sobre a formação de brotos e inibe a formação de raízes na base das galhas; a adição de ácido giberélico aos meios de cultura não afeta a formação de brotos. Porém, etapas posteriores deverão ser estudadas para

avaliar os efeitos de fitorreguladores na etapa de enraizamento e para aclimatizar as mudas em casa de vegetação.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Empresa TANAGRO pelo fornecimento de sementes. C.L.E. agradece ao CNPq pela bolsa de iniciação científica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CORRÊIA, P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1952.
- CRESPI, M.; MESSENS, E.; CAPLAN, A. B.; VAN MONTAGU, M.; DESOMER, J. Fasciation induction by the phytopathogen *Rhodococcus fascians* depends upon a linear plasmid encoding a cytokinin synthase gene. **EMBO Journal**, v. 11, p. 795-804, 1992.
- CRESPI M.; VEREECKE, D.; TEMMERMAN, W.; VAN MONTAGU, M.; DESOMER, J. The *fas* operon of *Rhodococcus fascians* encodes new genes required for efficient fasciation of host plants. **Journal of Bacteriology**, v. 176, p. 2492-2501, 1994.
- DESOMER J.; DHAESE, P.; VAN MONTAGU, M. Conjugative transfer of cadmium resistance plasmids in *Rhodococcus fascians* strains. **Journal of Bacteriology**, v. 170, p. 2401-2405, 1988.
- GOETHALS, K.; VEREECKE, D.; MONDHER, J.; VAN MONTAGU, M.; HOLSTERS, M. Leafy gall formation by *Rhodococcus fascians*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 39, p. 27-52, 2001.
- MAES, T.; VEREECKE, D.; RITSEMA, T.; CORNELIS, K.; THU, H. N. T.; VAN MONTAGU, M.; HOLSTERS, M.; GOETHALS, K. The *att* locus of *Rhodococcus fascians* strain D188 is essential for full virulence on tobacco through the production of an autoregulatory compound. **Molecular Biology**, v. 42, p. 13-28, 2001.
- MANES, C.-L. de O.; VAN MONTAGU, M.; PRINSEN, E.; GOETHALS, K.; HOLSTERS, M. De novo cortical cell division triggered by the phytopathogen *Rhodococcus fascians* in tobacco. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 14, p. 189-195, 2001.
- McKAY, M. J.; ROSS, J.J.; LAWRENCE N.L.; CRAMP, R.E.; BEVERIDGE, C. A.; REID, J. B. Control of internode length in *Pisum sativum*. **Plant Physiology**, v. 106, p. 1521-1526, 1994.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962

10. QUOIRIN, M.; SILVA, M. da; MARTINS, K.G.; OLIVEIRA, D.E. Multiplication of juvenile black wattle (*Acacia mearnsii* de Wild) by microcuttings. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 66, p. 199-205, 2001.
11. QUOIRIN, M.; BONA, C.; SOUZA, E.; SCHWARTSBURD, P. Induction of leafy galls in *Acacia mearnsii* De Wild seedlings infected by *Rhodococcus fascians*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47(3), 2004 (no prelo).
12. REID, J.B.; HOWELL, S. H. Hormone mutants and plant development. In: DAVIES, P. J. (Ed.) **Plant Hormones**. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, 1995, p. 467-473.
13. RIZZINI, C.T.; MORS, W. B. **Botânica econômica brasileira**. 2 ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural Edições LTDA., 1995.
14. SCHELL, J.; PALME, K.; WALDEN, R. Molecular approaches to the study of the mechanism of action of auxins. In: DAVIES, P. J. (Ed.) **Plant Hormones**. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, 1995, p. 355-356.
15. STANGE, R. Jr.; JEFFARES, D.; YOUNG, C.; SCOTT, D. B.; EASON, J. R. & JAMESON, P. E. PCR amplification of the *fas-1* gene for the detection of virulent strains of *Rhodococcus fascians*. **Plant Pathology**, v. 45, p. 407-417, 1996.
16. YOTSUYA, T., ICHII, T., SAWANO, M., NAKANISHI, T., OZAKI, T. Effects of bud scales and gibberellins on dormancy of *in vitro* cultured japanese pear leaf buds. **Scientia Horticulturae**, v. 24, p. 177-184, 1984.

Recebido em 10/03/2004

Aceito em 03/11/2004