

Na hora do aperto

Em condições extremas, planta usada na produção da tequila se alimenta das bactérias que vivem em seu interior

Igor Zolnerkevic

A tequila, famosa bebida destilada mexicana, é feita da polpa de uma planta de folhas longas, duras e espinhosas, o agave-azul (*Agave tequilana*). Típica do deserto, essa planta cresce em solos pobres e arenosos em parte graças aos nutrientes produzidos por bactérias que vivem harmoniosamente no interior de suas células. Mas, em momentos de necessidade extrema, como longos períodos de

seca ou sol intenso, o agave-azul sacrifica essas bactérias e se alimenta delas para sobreviver. “A planta literalmente consome suas bactérias para se manter viva”, explica o bioquímico Paolo Di Mascio, do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP).

Ele participou de uma equipe internacional que fez uma série de experimentos no IQ-USP e na Universidade Rutgers, nos Estados Unidos, e demons-

trou que o agave-azul digere a bactéria *Bacillus tequilensis*, normalmente encontrada em suas células. Essa estratégia permite à planta absorver ao menos parte dos nutrientes de que necessita para atravessar períodos de privação. Os resultados desse trabalho, publicado em novembro de 2014 no periódico *Scientific Reports*, revelam ainda que, mesmo quando há abundância de nutrientes, o agave-azul se beneficia da parceria com a



Agave-azul:
típico de regiões
com solo pobre e
arenoso e
matéria-prima
da tequila

no periódico *PLoS One*, indicaram que a luz solar, ao incidir sobre o pigmento melanina produzido pelo fungo, desencadeia reações fotoquímicas que geram moléculas de oxigênio excitado e levam à morte das células nas folhas da planta, deixando-as escurecidas. Os pesquisadores continuam a investigar a praga, conhecida como sigatoka-negra, agora para entender melhor como uma solução líquida desenvolvida por Beltrán-García e seus colaboradores conseguiu controlar a doença em plantações comerciais no México. A solução é feita de uma mistura de bactérias obtidas das próprias bananeiras e, além do efeito pesticida, serve como fertilizante.

Em paralelo à pesquisa sobre a praga das bananeiras, Beltrán-García segue preocupado com o futuro do agave-azul, um dos principais produtos agrícolas do estado mexicano de Jalisco, onde ficam a cidade de Guadalajara e o vilarejo de Tequila. A forte bebida destilada não é o único derivado do agave-azul fabricado em escala industrial. Dele também se extrai, depois da cocção, um xarope mais doce que o mel e a inulina, um açúcar usado na produção de alimentos. “A produção do agave-azul está sofrendo com doenças causadas por fungos e bactérias e com o ataque de insetos”, explica Beltrán-García.

FOME DE NITROGÊNIO

Na tentativa de aumentar a produtividade, os agricultores aplicam quantidades excessivas de fertilizantes – um fenômeno mundial na agricultura –, o que também traz consequências indesejáveis. Os fertilizantes contêm sais de nitrato e de cloreto de amônio, fonte de um dos nutrientes mais essenciais às plantas, o nitrogênio. Esse elemento químico entra na composição das proteínas, do DNA e da molécula de clorofila, pigmento responsável pela reação de fotossíntese que alimenta os vegetais. O problema é que

B. tequilensis: a presença da bactéria faz o agave crescer mais rápido, chegando a triplicar sua produção de biomassa.

Outras pesquisas recentes já haviam indicado que certas espécies de bactérias colaboram para o crescimento de plantas e o controle de pragas agrícolas. “Buscamos microrganismos que substituam ou reduzam o uso de fertilizantes e pesticidas”, diz Miguel Beltrán-García, pesquisador da Universidade Autônoma

de Guadalajara, no México, que liderou os estudos com o agave.

Beltrán-García conduziu esses experimentos em 2013, quando passou um ano no IQ-USP a convite de Di Mascio, seu colaborador há mais de uma década. Em conjunto com outra equipe internacional, eles identificaram uma via bioquímica pela qual o fungo *Mycosphaerella fijiensis* danifica as bananeiras. Os experimentos, descritos ano passado

apenas metade do nitrogênio dos fertilizantes é absorvida pelas plantas. O restante vai para o ambiente e pode prejudicar a qualidade do solo e contaminar ecossistemas distantes, quando é levado para longe pelo vento e pela água.

Por causa desses efeitos, buscam-se alternativas aos fertilizantes. Uma delas são bactérias que ajudam as plantas a extrair nitrogênio. Elas transformam o nitrogênio do ar (inerte para a maioria dos seres vivos) e de outros compostos em moléculas que as plantas podem absorver, como a amônia. Outras bactérias decompõem organismos mortos e disponibilizam compostos à base de nitrogênio para as plantas.

Mais recentemente se percebeu que as plantas também adquirem nitrogênio com a ajuda de outro tipo de microrganismo: as bactérias endofíticas, como o *Bacillus tequilensis*, que vivem no interior das células da planta em harmonia com a sua hospedeira. Ninguém sabe,

Água oxigenada produzida pelo agave pode digerir as bactérias endofíticas e decompor suas moléculas

porém, como os nutrientes produzidos por essas bactérias – estejam elas no solo, nas raízes ou nas células vegetais – são aproveitados pelo agave.

“É difícil estudar o fluxo de nutrientes dos micróbios para as plantas”, afirma James White, especialista na interação entre plantas e microrganismos da Universidade Rutgers, um dos colaboradores de Beltrán-García e Di Mascio no estudo da sigatoka-negra. “Provavelmente por isso ninguém realizou esse tipo de experimento”, conta White, que, com sua colega Monica Torres, também participou do trabalho com o agave-azul.

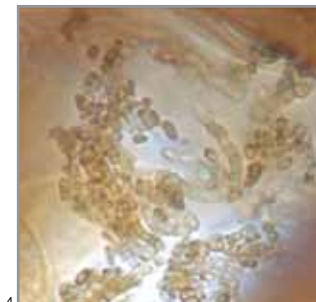
White estuda gramíneas que abrigam bactérias endofíticas e acredita que as plantas podem digerir os microrganismos por meio da produção de água oxigenada (H_2O_2). Com fórmula química semelhante à da água, a água oxigenada contém um átomo de oxigênio extra, que tende a reagir com outras moléculas. O pesquisador imagina que a água oxigenada liberada pela planta destrói as bactérias endofíticas e decompõe suas moléculas grandes em moléculas menores, que podem ser aproveitadas pelas células vegetais. “Temos evidência de que isso ocorre em algumas espécies, mas acreditamos que esse processo pode acontecer em todo o reino vegetal”, diz White. “A questão em aberto é saber quanto o nitrogênio proveniente das endofíticas é importante para a planta.” A resposta provavelmente deve variar de uma espécie de planta para outra e conforme as circunstâncias em que se encontra.

Em um dos experimentos, White e Monica observaram ao microscópio células da raiz do agave-azul lançarem água oxigenada sobre bactérias *B. tequilensis* inoculadas na planta. O teste, porém,



No laboratório: folhas são maceradas (acima) e cortadas (ao lado) para passar por dois tipos de análise que avaliam a incorporação de nitrogênio 15

No campo: plantação de agave em Tequila, no México, e colônia da bactéria *Bacillus tequilensis* encontrada sobre a raiz das plantas (destaque)



4



5

deixava uma dúvida: a liberação de água oxigenada seria uma reação de defesa da planta contra o excesso de bactérias ou uma forma de obter nutrientes?

SEGUINDO O ISÓTOPO

Di Mascio teve então a ideia de cultivar a *B. tequilensis* em laboratório, alimentando as bactérias com um nitrogênio especial, que poderia ser rastreado e, mais tarde, detectado em moléculas produzidas pelas plantas. Eles deram às bactérias um tipo de nitrogênio que pesa 15 unidades de massa atômica, diferente da maioria dos átomos de nitrogênio encontrados na natureza, que têm peso 14.

No IQ-USP, Fernanda Prado, Kátia Prieto e Marisa Medeiros, do Departamento de Bioquímica, e Lydiá Yamaguchi e Massuo Kato, do Departamento de Química Fundamental, alimentaram plântulas de agave-azul cultivadas em condições controladas com as bactérias contendo nitrogênio 15. Em um dos experimentos, as plântulas eram retiradas da estufa uma vez por semana, lavadas e esterilizadas. Depois passavam algumas horas em um vaso contendo apenas areia estéril e uma solução de *B. tequilensis*, o que simulava um ambiente pobre em nitrogênio. Os pesquisadores aumentavam o estresse do ambiente ao deixar o agave sob uma luz muito intensa.

Depois de seis meses, os pesquisadores coletaram as folhas que brotaram nesse período e as analisaram com o au-

xílio de espectrômetros de massa, equipamento capaz de distinguir os dois tipos de nitrogênio. Eles encontraram nitrogênio 15 tanto em aminoácidos (blocos formadores de proteínas) quanto no DNA e na feofitina, molécula derivada da clorofila. “A feofitina é típica da planta e não existe na bactéria”, explica Di Mascio. “Encontrar feofitina com nitrogênio 15 é a prova de que átomos das bactérias absorvidas pelas raízes foram parar em uma molécula criada pela planta.”

Em outro experimento, os pesquisadores compararam o crescimento das plântulas que não receberam doses semanais de *B. tequilensis* com aquelas que receberam as bactérias, vivas ou mortas. As plântulas alimentadas com bactérias vivas cresceram duas vezes mais do que as que receberam bactérias mortas e três vezes mais do que as alimentadas com uma solução mineral contendo nitrogênio. O resultado sugere que, além de fornecer nitrogênio, as *B. tequilensis* que vivem no agave-azul produzem hormônios de crescimento vegetal chamados de auxinas.

Estudos brasileiros feitos com cana-de-açúcar já haviam demonstrado que a inoculação de bactérias endofíticas pode acelerar consideravelmente o crescimento da planta. Em parceria com Antonio Figueira e Layanne Souza, da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da USP, Di Mascio e Kátia Prieto planejam realizar com a cana experimentos semelhantes aos feitos com o agave-azul.

“Trabalhar com a cana é mais difícil, porque em laboratório as mudas crescem com adição de muito açúcar”, explica Di Mascio. “O açúcar aumenta o risco de contaminação por outras bactérias e fungos, o que pode arruinar o experimento.”

Chanyarat Paungfoo-Lonhienne, pesquisadora da Universidade de Queensland, na Austrália, afirma que o resultado obtido com o agave “encoraja a investigar se esse também é um modo de nutrição para outras plantas”. Em 2010, ela liderou o primeiro estudo a mostrar que plantas – nesse caso, o tomate e a *Arabidopsis thaliana*, uma planta-modelo usada em pesquisas – são capazes de digerir bactérias e fungos invasores. Para Chanyarat, entender como funciona a interação dessas bactérias com as plantas e associar essa combinação a outras técnicas orgânicas pode levar a resultados interessantes: “Pode reduzir o uso de fertilizantes, se não substituí-lo totalmente”. ■

Projetos

1. Oxigênio singlete e peróxidos em química biológica (nº 2012/12663-1); Modalidade Projeto Temático; Pesquisador responsável Paolo Di Mascio (IQ-USP); Investimento R\$ 3.408.783,02 (FAPESP).
2. Redoxoma (2013/07937-8); Modalidade Centros de Pesquisa, Inovação e Difusão (Cepid); Pesquisador responsável Ohara Augusto; Investimento R\$ 22.604.697,96 (FAPESP – para todo o projeto).

Artigo científico

BELTRÁN-GARCÍA, M. J. et al. Nitrogen acquisition in *Agave tequiliana* from degradation of endophytic bacteria. *Scientific Reports*. v. 4, n. 6.938. 6 nov. 2014.