

Seleção *in vitro* de rizobactérias com potencial de colonização em raízes de alho nas cultivares Chonan e Roxo Caxiense

Leandro Luiz Marcuzzo¹, Rosane Garcez Cezar² e Adriana Maria Tomazi Scolaro³

Resumo – O objetivo deste trabalho foi isolar bactérias provenientes do rizoplano, da rizosfera e de túnicas de bulbo de alho de diversos locais de cultivo e avaliar a capacidade de colonização em raízes de alho nas condições *in vitro*. Bulbilhos de alho cultivar Chonan e Roxo Caxiense foram microbiolizados em suspensão bacteriana correspondente durante um período de 5,5 horas e após foram depositados em tubos de ensaio contendo ágar-água 0,8%. Posteriormente, foram acondicionados em câmara de crescimento a $24 \pm 2^\circ\text{C}$, e após 20 dias quantificou-se a porcentagem de raízes colonizadas em relação ao número total de raízes emergidas. Constatou-se que o isolado EHA/113 apresentou aproximadamente 96% de raízes colonizadas na cultivar Chonan, e na ‘Roxo Caxiense’ o isolado EHA/109 colonizou 75% das raízes.

Termos para indexação: *Allium sativum* L., bactéria, rizoplano, rizosfera.

In vitro selection of rhizobacteria with potential for colonizing garlic roots of Chonan and Roxo Caxiense cultivars

Abstract – The objective of this study was to isolate bacteria from rhizoplane, rhizosphere and tunic of garlic bulbs from several cultivation sites and to evaluate the capacity to colonize garlic roots *in vitro* conditions. ‘Chonan’ and ‘Roxo Caxiense’ garlic bulbs were microbiolized in bacterial suspension during a period of 5.5 hours, deposited in tubes with agar-water 0.8% and maintained in growth chamber at $24 \pm 2^\circ\text{C}$ for 20 days when the percentage of colonized roots were evaluated. Isolate EHA/113 colonized about 96% of ‘Chonan’ and isolate EHA/109 colonized 75% of ‘Roxo Caxiense’.

Index terms: *Allium sativum* L., bacteria, rhizoplane, rhizosphere.

O cultivo do alho ocupa uma posição de destaque na produção agrícola, pois é explorado intensivamente em quase todo o território nacional. Diversos são os fatores que contribuem para a baixa produtividade, destacando-se as doenças de diversas etiologias que causam prejuízos significativos à cultura. Grande parte dessas doenças

é controlada com defensivos agrícolas que, muitas vezes, são aplicados de forma inadequada, restando para o ambiente uma carga residual (Dellamatrice, 2000). Baseado neste aspecto, a sociedade pressiona a pesquisa a investigar métodos alternativos para o aumento de produtividade e controle de doenças de plantas, com menor custo de produção

e que sejam, ao mesmo tempo, eficientes e menos agressivos à saúde humana e ao equilíbrio dos ecossistemas (Mariano & Romeiro, 2000).

As soluções para aumentar a produção e diminuir a utilização de defensivos agrícolas podem estar presentes na própria planta, junto ao sistema radicular. O solo abriga

Aceito para publicação em 14/11/07.

¹Eng. agr., M.Sc., Universidade do Contestado, C.P. 232, 89500-000 Caçador, SC, fone: (49) 3561-6200.

²Eng. da Horticultura, Sesi/Meio-Oeste, Rua Perimetral, 610, km 0,5, Alto Bonito, 89500-000 Caçador, SC, fone: (49) 3561-1200, e-mail: rosane.garcez@sesimeioeste.com.br.

³Eng. da Horticultura, Epagri/Estação Experimental de Caçador, C.P. 591, 89500-000 Caçador, SC, fone: (49) 3561-2000, e-mail: adrianascolaro@epagri.sc.gov.br.

uma quantidade diversificada de microrganismos, sendo que muitos destes organismos são bactérias que elegem como nichos ecológicos a rizosfera e/ou o rizopiano de plantas, onde se multiplicam e sobrevivem ativamente, resistindo à pressão do restante da microbiota do solo (Mariano & Romeiro, 2000). Estes organismos conhecidos como rizobactérias (Kloepper et al., 1980) interagem com a planta, podendo apresentar efeito deletérico, nulo ou benéfico (Kloepper & Beauchamp, 1992).

As rizobactérias benéficas que influenciam na promoção de crescimento de plantas e no controle biológico de enfermidades recebem o nome de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR) e têm sido utilizadas para aumentar a produtividade das culturas e biocontrolar fitopatógenos (Liu et al., 1995).

É de fundamental importância identificar a possibilidade de selecionar rizobactérias na cultura de alho, a fim de que se possa reduzir a utilização de defensivos e fertilizantes para o aumento da produtividade e reduzir também o impacto que a cultura exerce sobre o ambiente.

O objetivo deste trabalho foi isolar bactérias provenientes de cultivos de alho de diferentes lavouras e avaliar a capacidade colonizadora das mesmas em raízes de alho das cultivares Chonan e Roxo Caxiense, na condição *in vitro*.

Obtenção dos isolados

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia da Universidade do Contestado – Campus Universitário de Caçador. O isolamento foi efetuado em novembro de 2002, e a avaliação da colonização, nos meses de janeiro e fevereiro de 2003.

Dez plantas de alho de diferentes cultivares foram coletadas em lavouras comerciais de Caçador, SC, e acondicionadas em caixa de isopor contendo gelo para manutenção da temperatura durante o transporte até o laboratório, onde, posteriormente, procedeu-se ao isolamento das bactérias.

Isolados de túnicas de bulbos:

Os isolados bacterianos deste sítio foram obtidos através da adição de 10g de túnicas de bulbos de alho em 90ml de solução salina (NaCl 0,85%) e agitação por 30 minutos. As suspensões foram submetidas a diluições seriadas e plaqueadas em meio de cultura 523 (Kado & Heskett, 1970). As placas foram incubadas a 28°C por até 7 dias, e as colônias isoladas foram repicadas para tubos de ensaio contendo o mesmo meio.

Isolados da rizosfera e do rizopiano:

10g da camada de solo aderida às raízes foram adicionadas a 90ml de solução salina (NaCl 0,85%), e mantidos em agitação por 30 minutos. Posteriormente, as suspensões foram submetidas a diluições seriadas, plaqueadas em meio de cultura 523 e incubadas por até 7 dias a 28°C.

Os isolados de rizopiano foram obtidos das mesmas raízes que, depois de lavadas em água corrente e adicionadas em Erlenmeyers con-

tendo solução salina (NaCl 0,85%) na proporção de 10g de raízes para 90ml de solução, foram deixadas sob agitação durante 30 minutos. Após este período, as suspensões foram semeadas em placas de Petri com o mesmo meio de cultura e incubadas por até 7 dias a 28°C. Em ambos os casos, as colônias surgidas foram repicadas para tubos contendo meio 523.

Avaliação da capacidade colonizadora de bactérias em raízes de alho:

Em decorrência de a maioria dos isolados bacterianos ser originada de plantas de alho das cultivares Chonan (Tabela 1) e Roxo Caxiense (Tabela 2), estes foram avaliados na própria cultivar, independentemente do sítio de isolamento. Bulbilhos de alho das cultivares Chonan e Roxo Caxiense, com média de 3g, foram desinfetados superficialmente em álcool 70% e hipoclorito de sódio 1%, durante 5 minutos, e lavados em água esterilizada por duas vezes. Imediatamente

Tabela 1. Porcentagem média de colonização radicular na cultivar de alho Chonan com isolados obtidos de diferentes sítios de isolamento e a respectiva cultivar em que foram coletados. Caçador, SC, 2003⁽¹⁾

Isolado	Sítio de isolamento	Cultivar do isolamento	Colonização ⁽²⁾ %
EHA/113	Rizopiano	Chonan	95,82a
EHA/115	Rizopiano	Quitéria	82,12b
EHA/81	Rizopiano	Chonan Gaúcho	58,34c
EHA/79	Rizosfera	Quitéria	56,17d
EHA/114	Rizopiano	Chonan	50,00d
EHA/89	Rizopiano	Chonan Gaúcho	50,00d
EHA/77	Rizosfera	Chonan	32,15e
EHA/41	Túnica	Chonan Gaúcho	20,00f
EHA/52	Rizosfera	Chonan Gaúcho	19,65f
EHA/46	Túnica	Fuego Inta	12,50g
EHA/86	Rizopiano	Chonan Gaúcho	8,32h
EHA/51	Rizosfera	Chonan Gaúcho	5,00i
EHA/39	Túnica	Chonan Gaúcho	0,00j
EHA/47	Túnica	Fuego Inta	0,00j
EHA/ 53	Rizosfera	Chonan Gaúcho	0,00j
EHA/76	Rizosfera	Chonan	0,00j
Testemunha			0,00j
CV(%)			14,72

⁽¹⁾Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

⁽²⁾Antes da análise, as porcentagens de colonização (x) foram submetidas à transformação $y = \sqrt{x + 1}$. Os dados são apresentados na escala original.

Nota: CV = coeficiente de variação.

Tabela 2. Porcentagem média de colonização radicular na cultivar Roxo Caxiense com isolados bacterianos de diferentes sítios de isolamento e a respectiva cultivar em que foram coletados. Caçador, SC, 2003⁽¹⁾

Isolado	Sítio de isolamento	Cultivar do isolamento	Colonização ⁽²⁾ %
EHA/109	Rizoplano	Roxo Caxiense	75,00a
EHA/92	Rizoplano	Roxo Caxiense	66,67 b
EHA/113	Rizoplano	Chonan	66,67 b
EHA/57	Rizosfera	Roxo Caxiense	50,00 c
EHA/80	Rizosfera	Quitéria	25,00d
EHA/95	Rizoplano	Roxo Caxiense	25,00 d
EHA/42	Rizosfera	Roxo Caxiense	20,00 e
EHA/98	Rizoplano	Roxo Caxiense	16,67 f
EHA/44	Túnica	Roxo Caxiense	14,28 f
EHA/62	Rizosfera	Roxo Caxiense	0,00 g
EHA/63	Rizosfera	Roxo Caxiense	0,00 g
EHA/64	Rizosfera	Roxo Caxiense	0,00 g
EHA/75	Rizosfera	Roxo Caxiense	0,00 g
EHA/56	Rizosfera	Roxo Caxiense	0,00 g
EHA/90	Rizoplano	Roxo Caxiense	0,00 g
EHA/91	Rizoplano	Roxo Caxiense	0,00 g
EHA/54	Rizosfera	Roxo Caxiense	0,00 g
EHA/93	Rizoplano	Roxo Caxiense	0,00 g
EHA/94	Rizosfera	Roxo Caxiense	0,00 g
EHA/58	Rizosfera	Roxo Caxiense	0,00 g
EHA/96	Rizoplano	Roxo Caxiense	0,00 g
EHA/59	Rizosfera	Roxo Caxiense	0,00 g
EHA/99	Rizoplano	Roxo Caxiense	0,00 g
EHA/100	Rizoplano	Roxo Caxiense	0,00 g
EHA/101	Rizoplano	Roxo Caxiense	0,00 g
EHA/104	Rizoplano	Roxo Caxiense	0,00 g
EHA/105	Rizoplano	Roxo Caxiense	0,00 g
EHA/106	Rizoplano	Roxo Caxiense	0,00 g
EHA/107	Rizoplano	Roxo Caxiense	0,00 g
EHA/108	Rizoplano	Roxo Caxiense	0,00 g
EHA/60	Rizosfera	Roxo Caxiense	0,00 g
EHA/110	Rizoplano	Roxo Caxiense	0,00g
EHA/112	Rizoplano	Roxo Caxiense	0,00 g
EHA/61	Rizosfera	Roxo Caxiense	0,00 g
EHA/114	Rizoplano	Chonan	0,00 g
EHA/116	Rizoplano	Quitéria	0,00 g
EHA/117	Rizoplano	Quitéria	0,00 g
Testemunha			0,00 g
CV(%)			18,74

⁽¹⁾Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

⁽²⁾Antes da análise, as porcentagens de colonização (x) foram submetidas à transformação $y = \sqrt{x + 1}$. Os dados são apresentados na escala original.

Nota: CV = coeficiente de variação.

te os bulbilhos foram imersos em 30ml de suspensão de cada um dos isolados, preparada em solução salina (NaCl 0,85%) cuja concentração foi ajustada pela escala de Mc Farland n° 2 e agitados durante 5,5 horas em temperatura ambiente ($20 \pm 2^\circ\text{C}$). Após este período, cada bulbilho foi depositado em tubo de ensaio (15cm x 1cm) contendo 15ml de ágar-água 0,8% (Figura 1). Em seguida, os tubos foram acondicionados em suporte metálico e transferidos para câmara de crescimento sob iluminação fluorescente constante em temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$.

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado com quatro repetições, contendo um bulbilho em cada repetição para cada isolado bacteriano. A testemunha consistia em bulbilhos imersos em solução salina (NaCl 0,85%).

A avaliação foi realizada no 20º dia após a microbiolização dos bulbilhos, observando-se visualmente o comportamento das rizobactérias pela contagem do número de raízes que foram colonizadas e do número total de raízes emergidas (Figura 1B) e calculando-se a relação entre estes valores e a porcentagem de raízes colonizadas. Para a análise estatística, os valores originais foram transformados em $\sqrt{x + 1}$ e submetidos à análise de variância (Anova), e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5%.

Dos diferentes sítios de isolamentos, obteve-se um total de 53 isolados bacterianos, dos quais 16 foram avaliados para a colonização da cultivar Chonan e 37 para a da 'Roxo Caxiense'.

Na avaliação da colonização para a cultivar Chonan destacou-se o isolado bacteriano EHA/113, o qual apresentou 95,8% das raízes colonizadas, seguido pelo isolado EHA/115 com 82% de colonização (Tabela 1). Esses resultados indicam que as bactérias colonizadoras nesta cultivar podem apresentar potencial de controle biológico e/ou promoção de crescimento *in vivo* (Habe & Uesugi, 2000).

Para a cultivar Roxo Caxiense, destacaram-se os isolados EHA/109

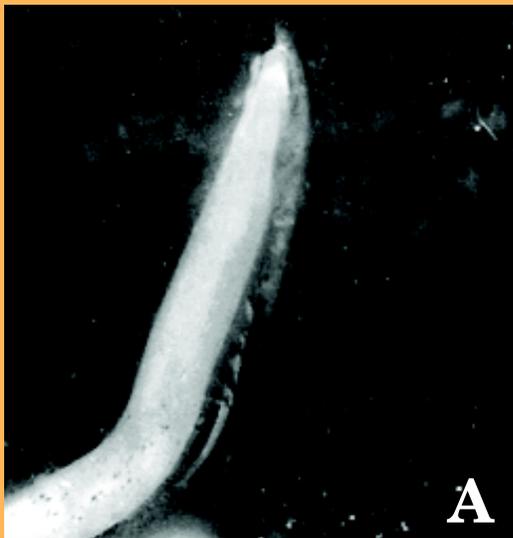


Figura 1. (A) Aspecto leitoso no sistema radicular de alho colonizado com rizobactéria; (B) Desenvolvimento do sistema radicular em tubo de ensaio contendo ágar-água 0,8%

com 75% de colonização e EHA/92 e EHA/113, ambos com 66,67% de colonização (Tabela 2). Observou-se também que o isolado EHA/57 apresentou 50% das raízes colonizadas, o que é considerado um bom índice. Para esta cultivar constatou-se que, dos 37 isolados avaliados, 28 não apresentaram colonização, comprovando que nem todas as bactérias isoladas de raízes de plantas possuem a capacidade de colonização (Schort & Pancocks, 1982).

Dentre os 53 isolados avaliados para a colonização do sistema radicular, destacaram-se na cultivar Chonan os isolados EHA/113 e EHA/115, e os isolados EHA/109, EHA/92, EHA/113 e EHA/57, na cultivar Roxo Caxiense.

Literatura citada

1. DELLAMATRICE, P.M. *Degradação do herbicida 14C Diuron por Acinetobacter baumannii e pela microbiota do solo*. 2000. 53p. Dissertação (Mestrado em Ciências - Energia Nuclear na Agricultura). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

2. HABE, M.H.; UESUGI, C.H. Método *in vitro* para avaliar a capacidade colonizadora de bactérias em raízes de tomateiro. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.25, n.4, p.657-660, 2000.

3. KADO, C.I.; HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, St. Paul, v.60, p.24-30, 1970.

4. KLOPPER, J.W.; BEAUCHAMP, C.J. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.38, p.1219-1232, 1992.

5. KLOPPER, J.W.; LEONG, J.; TEINTZ, M. et al. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth promoting rhizobacteria. *Nature*, London, p.285-286, 1980.

6. LIU, L.; KLOPPER, J.W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber by plant growth-promoting rhizobacteria: duration of protection and effect of host resistance on protection and root colonization. *Phytopathology*, St. Paul, v.85, n.10, p.1064-1068, 1995.

7. MARIANO, R.L.R.; ROMEIRO, R.S. Indução de resistência sistêmica por rizobactérias promotoras de crescimento de plantas. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. *Controle biológico*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. v.2. p.305-320.

8. SCHORT, M.N.; PANCOCK, J.G. Disease-suppressive soil and root-colonizing bacteria. *Science*, New York, v.216, p.1.376-1.381, 1982.

Cursos sobre Plantas Bioativas

11 a 15 de agosto de 2008

Centro de Treinamento de Itajaí - Cetrei
Rodovia Antônio Heil, km 6, Itajaí, SC

Cultivo, processamento e utilização de plantas bioativas

Informações

Saete Duarte de Oliveira (47) 3341-5235,
Alcemira Bagatini (47) 3341-5236
E-mail: cetrei@epagri.sc.gov.br

