COLONIZAÇÃO DE RAÍZES DE ARROZ POR ISOLADOS BACTERIANOS AVALIADA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Zarela Gudelia Casas Navarro Zanatta[1]; Luis Antonio Suita de Castro[2]; Nara Eliane Moreira Rocha[3]; Lizandro Ciciliano Tavares[4]

Palavras-chave: Microbiolização, sementes, Xisto, *Oryza sativa* L.

INTRODUÇÃO

Os microrganismos do solo são de fundamental importância na agricultura e dentro destes encontram-se algumas bactérias chamadas de rizobactérias promotoras de crescimento (RPCPs). Quando presentes nas sementes, solo ou material de propagação pode suprimir doenças e/ou proporcionar uma promoção de crescimento, podendo atuar em diversos mecanismos como: controle biológico pela competição por nutrientes com patógenos, produção de sideróforos e antibióticos, resistência induzida a doenças e promoção de crescimento diretamente pela produção de fitormônios e aumento da disponibilidade de nutrientes pela fixação de nitrogênio ou solubilização de fósforo (KLOEPPER,1993). A condição de estabelecimento bacteriano na rizosfera é fundamental para que o microrganismo possa interagir com a planta. Além disso, é necessário que a bactéria se espalhe ao longo da raiz e não perca a capacidade de sobreviver e multiplicar-se de maneira competitiva em relação à comunidade nativa. A colonização radicular é um processo muito complexo, pois diferentes microrganismos estão sujeitos a diversos fatores bióticos e abióticos, como umidade do solo, luz, exsudação radicular e etc. Na tentativa de monitorar o processo de colonização radicular por rizobactérias, vários pesquisadores desenvolveram técnicas *in vitro*, Habe e Uesugi (2000) método do plaqueamento, (GUPTA et al.,1995; CHANWAY et al., 2000), ou pela visualização em microscópio eletrônico (CHIN-A-WOENG et al., 1997; DEKKERS et al., 2000).

Nesse contexto objetivou-se com esse estudo avaliar a capacidade de isolados bacterianos em colonizar raízes de plântulas de arroz com bactérias antagonistas provenientes do xisto.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas sementes de arroz da cultivar El Passo L144. Estas foram desinfetadas com solução de hipoclorito de sódio a 2,5 % por um minuto e, depois, lavadas em água destilada e esterilizada. Foram utilizadas 9 isolados bacterianos com potencial de antibiose obtidos do xisto pertencente à coleção de culturas da Embrapa Clima Temperado (CPACT). As sementes de arroz foram imersas em suspensão salina (NaCl 0,85%) contendo separadamente cada um dos isolados, que foram cultivados previamente em meio de cultura 523 de Kado e Heskett com 48 h de crescimento. A concentração foi ajustada para OD_{540}= 0,50 e agitadas por 30 minutos, as sementes microbiolizadas foram retiradas e colocadas sobre papel de filtro e, a seguir, semeadas em tubos de ensaio (uma semente por tubo) contendo ágar-água, a 0,6 %, com 5 repetições de cada tratamento/isolado. Os tubos foram incubados a 25ºC com fotoperíodo de 12 horas, e após sete dias foi avaliada a colonização nas raízes. Utilizaram-se, como testemunha, sementes imersas em solução

[1] Engenheira Agrônoma. Dra. do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes. Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Departamento de Fitotecnia, campus Universitário, Caixa Postal 354 – CEP 96001-970 Capão do Leão-RS. Email: zarelacasas@yahoo.com.br.
[2] Eng Agrônomo. Msc.Pesquisador da Embrapa Clima Temperado. Email:luis.suita@cpact.embrapa.br
[3] Laboratorista da Embrapa Clima Temperado. Email : nara@cpact.embrapa.br
[4] Engenheiro Agrônomo. Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes. Email: lizandro_cicilianotavares@yahoo.com.br.

salina. Os tubos foram observados a olho nu, contra luz, verificando-se a turvação do meio ao redor do sistema radicular, indicativo da presença da bactéria.

A avaliação foi realizada atribuindo-se notas de 0 - 3, sendo: 3 - colonização total das raízes; 2 - colonização de 1/3 a ¾ das raízes; 1 - colonização de até 1/3 das raízes; e 0 - sem colonização. A comprovação da colonização foi obtida via Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Foram coletadas raízes das plântulas e imediatamente colocadas no fixador de Karnovsky, onde permaneceram por 24 horas a temperatura de 4ºC, o material então, foi retirado desta solução e passado por 3 banhos de 15 minutos com a solução tampão de cacodilato de sódio 0,2 M pH 7,2. Após feita a 2ª fixação com a solução de tetróxido de ósmio 1%, o material foi lavado 2 vezes com H_2O bidestilada por 10 minutos para banho. Logo, foram realizadas desidratações sucessivas em álcool, sendo 2 banhos de 5 minutos, com as seguintes concentrações: 30%, 50%, 70%, 90%, e 95%. A desidratação foi finalizada com 3 banhos de 10 minutos com etanol a 100%. Em seguida, a amostra foi conduzida para o aparelho de ponto crítico, utilizando etanol 100%, onde, ocorreu a troca do etanol 100% por CO_2 líquido. A seguir, o aparelho foi aquecido e o CO_2 e transformado em gás, sendo que a amostra saiu do aparelho totalmente seca e intacta, após, sendo montada em porta amostra previamente identificada. Por último, foi colocada prata líquida ao redor da espécie, para melhor condução dos elétrons no microscópio eletrônico. Depois de secar a prata, a amostra foi metalizada com ouro e observada no MEV DSM 940 A ZEISS.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após observações diárias dos tubos verificou-se que o crescimento dos nove isolados bacterianos apresentou uma névoa turva, de aspecto esbranquiçado, ao longo e em volta da raiz, as quais foram consideradas colonizadas. Para o registro desses resultados, considerou-se, como positivo, o crescimento em três ou quatro tubos de ensaio e, como negativo, a ausência do crescimento em três ou quatro dos tubos. Resultados semelhantes foram encontrados por Zanatta et al. 2004, que trabalhou com a mesma cultivar com diferentes isolados. Em relação ao maior número de bactérias colonizadoras houve uma maior ocorrência de bactérias no sistema radicular das plantas do que na região do colo. Dos 9 isolados, 6 colonizaram a região radicular e 3 isolados colonizaram o colo. A partir desses resultados, verifica-se que as bactérias testadas apresentaram formas de colonização diferentes, ou seja, algumas bactérias colonizaram o sistema radicular, outras o colo ou, nenhum dos dois órgãos vegetativos. Habe e Uesugi (2000) também observaram diferenças na colonização e verificaram que o número de bactérias que colonizaram o rizoplano (sistema radicular) foi maior que de bactérias que colonizaram a rizosfera. Os seis isolados que colonizaram totalmente o sistema radicular, de acordo com a avaliação que considerou a presença de névoa ao longo das raízes, também foram positivos na avaliação da colonização na região do colo. Em seguida, as plântulas foram retiradas dos tubos de ensaio com ágar e o sistema radicular separado da parte aérea e colocado no Microscópio de varredura para observação e confirmação da presença de bactérias. Os resultados indicam que os isolados 1016, 1045 (Figura 1) foram capazes de colonizar as raízes das plântulas de arroz e que estejam envolvidas na promoção do crescimento que envolve mecanismos como formação de pelos radiculares e/ou a formação de raízes laterais.

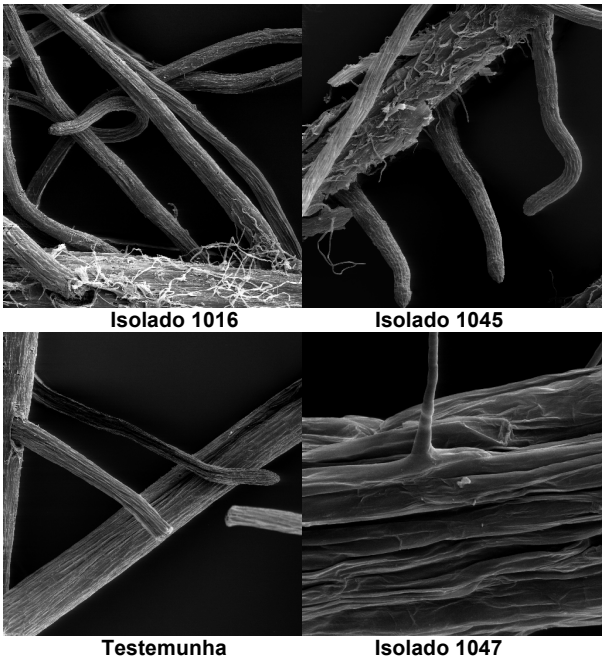

Figura 1: Microscopia eletrônica de varredura demonstrando a colonização por isolados bacterianos em raízes de plântulas de arroz.

Tabela 1. Avaliação dos Isolados bacterianos utilizados na microbiolização de sementes de arroz da cultivar EL Passo L144.

Isolado	Raiz principal				Colonização				Nota			
1166	X	X	X	X	+	+	+	+	2	2	2	2
1030	X	X	X	X	+	+	+	+	2	2	2	2
500	X	X	X	0	+	+	+	-	3	3	3	0
11655	X	X	X	X	+	+	+	+	3	2	3	3
503	0	X	X	X	-	+	+	+	0	2	2	2
1061	X	X	X	X	+	+	+	+	3	3	3	2
1047	X	X	X	X	+	+	+	-	3	3	3	0
1045	X	X	X	0	+	+	+	-	3	3	3	0
1016	X	X	X	X	+	+	+	+	2	3	3	3
Test	0	0	0	X	-	-	-	-	0	0	0	0

As sementes consideradas testemunha não apresentaram sinais de colonização. Ausência da fonte de carbono no meio utilizado, composto apenas por ágar e água, permitindo o desenvolvimento somente das bactérias que conseguem sobreviver utilizando os exsudatos radiculares das plântulas de arroz ou que são quimiotaticamente atraídas. Observou-se que o isolado 1047 não apresentou resultado satisfatório pela microscopia de varredura eletrônica. As análises utilizando microscopia eletrônica de varredura permitiram confirmar estes resultados.

CONCLUSÃO

Isolados bacterianos provenientes do xisto são capazes de colonizar raízes de plântulas de arroz.

A microscopia eletrônica de varredura é uma ferramenta eficaz para auxiliar no entendimento do modo de ação dos isolados bacterianos, bem como revelar detalhes de suas estruturas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHANWAY, C.P.; SHISHIDO, M.; NAIRN, J.; JUNGWIRTH, S.; MARKHAM, J.;XIAO, G.; HOLL, F.B. Endophytic colonization and field responses of hybrid spruce seedlings after inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. **Forest Ecology and Management**, v. 133, p. 81-88, 2000.

CHIN-A-WOENG, T.F.C.; DE PRIESTER, W.; VAN DER BIJ, A.J.; LUGTENBERG, B.J.J. Description of the colonization of a gnotobiotic tomato rizosphere by *Pseudomonas fluorencens* biocontrol strain WC365 using scanning electron microscopy. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 86, p. 10-79, 1997.

DEKKERS, L.C.; MULDERS, I.H.M.; PHOELICH, C.C.; CHIN-A-WOENG,T.F.C.; WIJFJES, A.H.M.; LUGTENBERG, B.J.J. The sss colonization gene of the tomato-*fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* biocontrol strains *Pseudomonas fluorencens* WC365 can improve root colonization of other wild type *Pseudomonas* bacteria. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.13, p.1177-1183, 2000.

GUPTA, S.; ARORA, D.K.; SRIVASTAVA, A.K. Growth promotion of tomato plants by rhizobacteria and imposition of energy stress on *Rhizoctonia solani*.**Soil Biology and Biochemistry**, v. 27, n. 8, p. 1051-1058, 1995.

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

KADO, C.I.; HESKETT, M.G. (1970). Selective media for isolation of *Agrobacterium, Corynebacterium, Erwinia, Pseudomonas* and *Xanthomonas.* **Phytopath**., 60, 24-30.

KLOEPPER, J.W. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents**.** In: **Soil Microbial Ecology, Applications in Agricultural and Environmental Management.** New York: Ed. FBJ meeting, 1993. p. 255-274.

ZANATTA, Z.C.N., SCHAFER, J.T., MOURA, A.B., LUDWIG, J.; SANTOS, A.S. Colonização do sistema radicular de sementes de arroz por rizobactérias biocontroladoras e promotoras de crescimento. **Fitopatologia Brasileira** 29 (Supl.) :175. 2004.