

10^o

FEPEG FÓRUM

ENSINO • PESQUISA
EXTENSÃO • GESTÃO

RESPONSABILIDADE SOCIAL: INDISSOCIABILIDADE
ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA



ISSN 1806-549 X

Autor(es): MARCELLY THAÍ S DE CASTRO, ISABELLE CAROLYNE CARDOSO, ADELICA APARECIDA XAVIER, CLÁUDIA MARIA DA SILVA, REGINA CÁSSIA FERREIRA RIBEIRO, GLEIKA LARISSA OLIVEIRA DORASIO DE SOUZA

Avaliação de Métodos de Dispensa de Rizobactérias em Raízes de Feijão Comum

Introdução

As Rizobactérias Promotoras de Crescimento em Plantas (RPCP's) são microrganismos capazes de colonizar as raízes, podendo beneficiar a planta (MAJEED et al., 2015). Assim, as informações adquiridas sobre esses microrganismos podem servir para direcionar a utilização deles em formulações de produtos, contribuindo para uma agricultura sustentável, já que pode diminuir o uso de fertilizantes (BASHAN et al., 2014).

Objetivou-se avaliar diferentes métodos de dispensa de rizobactérias no feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) em casa de vegetação.

Material e métodos

A. Preparo da suspensão bacteriana

Neste trabalho foram utilizados 5 isolados de rizobactérias oriundos de raízes de bananeira "Prata Anã". Os dados da sequência parcial da região 16S rRNA das bactérias identificadas foram depositadas na base de dados do GenBank.

As bactérias foram cultivadas em meio TSA (Tryptic Soy Agar), em placas de Petri por um período de 24 h a 28°C e conservadas em água mineral autoclavada (estoque). Em seguida, os isolados foram submetidos ao ajuste da densidade ótica a 1,0 de absorbância, no comprimento de onda (λ) a 540 nm em espectrofotômetro. Para isso, foram inoculados 100 μ L do isolado estoque que foi cultivado em 100 mL de meio líquido TSB (Tryptic Soy Broth), mantidos em agitador automático a 120 rpm e temperatura de 28°C por um período de 48 h. Depois do período de crescimento, esses isolados foram transferidos para tubos que foram centrifugados por 10 minutos a velocidade de 10.000 rpm para precipitação das células bacterianas. O sobrenadante foi descartado e as suspensões foram preparadas adicionando-se ao precipitado a solução salina a 0,85% para posterior leitura no espectrofotômetro.

B. Avaliação da colonização das raízes

A suspensão bacteriana padronizada foi utilizada para avaliar a colonização de raízes de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) em casa de vegetação. Este procedimento foi realizado para verificar qual a melhor forma de dispensa de rizobactérias (microbiolização de semente germinada, microbiolização de semente não germinada ou rega no sulco) para futuros trabalhos. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3x5x2, sendo três formas de inoculação, cinco isolados e dois tempos de avaliação, com cinco repetições. A multiplicação dos isolados foi realizada como descrito anteriormente. Para a avaliação, 330 sementes de feijão foram desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1%, por dez minutos (CHUN et al. (1997). Em seguida, foram lavadas, por quatro vezes em água destilada estéril e colocadas para secar em fluxo laminar por duas horas. Dessas sementes, foram colocadas 110 unidades para germinar e 220 foram acondicionadas em placas esterilizadas e hermeticamente fechadas para posterior utilização.

Para a germinação das sementes utilizaram-se folhas de papel (Germitest) umedecidas 2,25 vezes a sua massa com água destilada (Figura 1A). As sementes foram depositadas sobre duas folhas e cobertas com uma terceira. Em seguida, as folhas foram enroladas e depositadas em câmaras de germinação BOD com umidade de 92% e temperatura de 25°C, permanecendo nesta condição por um período de cinco dias, conforme normas descritas nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

Após a emissão da radícula, 100 sementes inoculadas com rizobactérias foram transplantadas para recipientes de 100 mL contendo areia lavada e autoclavada (Figura 1B). Além disso, 100 sementes das que foram anteriormente reservadas sem germinação foram inoculadas com rizobactérias, e a outras 100 foram plantadas e posteriormente realizada a rega com a solução de rizobactérias previamente preparada. Nos dois últimos casos, as sementes também foram colocadas em recipientes de 100 mL contendo areia lavada e autoclavada. Para as testemunhas foram utilizadas sementes germinadas e sem germinação, ambas sem a inoculação de rizobactérias, e rega no sulco com solução salina 0,85% sem as rizobactérias.

10^o

FEPEG FÓRUM

ENSINO • PESQUISA
EXTENSÃO • GESTÃO
RESPONSABILIDADE SOCIAL: INDISSOCIABILIDADE
ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA



ISSN 1806-549 X

As raízes foram colocadas em tubos de 20 mL, que foi completado com 2 mL de água destilada e esterilizada, considerando então a diluição de 1:10. Os tubos foram submetidos a agitação em agitador vortex por 1 minuto para desagregação das células bacterianas e logo em seguida a suspensão foi plaqueada em placas de Petri contendo meio TSA. Estas foram incubadas em câmara B.O.D a 28° e , após o crescimento bacteriano, foram contadas as unidades formadoras de colônia (UFC). Dessa forma, foram avaliados 2 tempos de colonização, um aos cinco dias e outro aos nove dias após o plantio.

C. Análise dos dados

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade por meio do programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011).

Resultados e discussão

Os resultados para a avaliação da colonização de raízes mostraram que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) quanto o método de dispensa de rizobactérias e quanto ao tempo de avaliação (5 e 9 dias após a inoculação). Por outro lado, houve diferença significativa quanto aos isolados avaliados ($p < 0,05$) (Tabela 1), sendo que as melhores médias foram de 96 e 95 UFC para os isolados 68 e 79 respectivamente.

A melhor opção de dispensa das rizobactérias é a microbiolização de sementes sem germinar, que é menos onerosa. Geralmente, a dispensa de rizobactérias é realizada por microbiolização de sementes (FERRAZ et al., 2015), sendo um método que permite o início do processo de colonização desde o lançamento da radícula na semente. Desse modo, tal método promove o melhor estabelecimento do microrganismo na planta (FERRAZ et al., 2008).

Conclusões

A inoculação por microbiolização de sementes (germinada e sem germinar) ou rega diretamente no sulco não influencia na colonização pelas rizobactérias, sendo a melhor opção para futuros trabalhos em casa de vegetação a inoculação por microbiolização, que é menos onerosa.

O tempo de avaliação também não influencia a colonização pelas rizobactérias.

Os isolados 68 e 79 apresentam a melhor colonização de raízes.

Agradecimentos

À CAPES pela concessão da bolsa de Doutorado, à FAPEMIG pela concessão da bolsa de incentivo à pesquisa e ao BIPDT pelo financiamento do projeto de pesquisa.

Referências bibliográficas

- BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E.; PRABHU, S. R.; HERNANDEZ, J. P. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998-2013). *Plant and Soil*, v. 378, n. 1-2, p. 1–33, 2014.
- BRASIL. **Regras para análise de sementes**. [s.l.: s.n.]
- CHUN, S.-C.; SCHNEIDER, R. W.; COHN, M. a. Sodium Hypochlorite: Effect of Solution pH on Rice Seed Disinfestation and Its Direct Effect on Seedling Growth. *Plant Disease*, v. 81, n. 7, p. 821–824, 1997.
- FERRAZ, H. G. M.; MILAGRES, E. A.; MOREIRA, P. C.; ROMEIRO, R. S. Métodos de dispensa do antagonista *Pseudomonas putida* (UFV-0073) no biocontrole da mancha-bacteriana e pinta-bacteriana do tomateiro. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, v. 10, n. 1, p. 123–127, 2015.
- FERRAZ, H. G. M.; ROMEIRO, R. da S.; GARCIA, F. A. de O.; SOUZA, A. neves de. Biocontrole da mancha-alvo do tomateiro por *Bacillus cereus* em Função do Modo de Dispensa na Planta Biocontrol of tomato target spot by *Bacillus cereus* as a function of the deliver mode. n. August, p. 33–37, 2008.
- FERREIRA, D. F. SISVAR : A Computer statistical analysis system. *Ciencia e Agrotecnologia*, v. 35, n. 6, p. 1039–1042, 2011.
- MAJEED, A.; KALEEM ABBASI, M.; HAMEED, S.; IMRAN, A.; RAHIM, N. Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from wheat rhizosphere and their effect on plant growth promotion. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, n. MAR, p. 1–10, 2015.



Tabela 1. Médias do número de unidades formadoras de colônia (UFC) de mudas de feijoeiro cujas sementes foram microbiolizadas com rizobactérias, isoladas de bananeira Prata-Anã.

Isolado	Gênero/espécie mais relacionado	UFC/Raiz*
41	<i>Bacillus amiloquefaciens</i>	76 a
65	<i>Bacillus amiloquefaciens</i>	88 c
†68		96 d
†70		85 b
†79		95 d
Testemunha		28 e
CV (%)		2,54

*Médias seguidas de diferentes letras diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

†Isolado em fase de identificação.



Figura 1. Metodologia utilizada para avaliar a colonização de raízes de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) por 5 isolados de rizobactérias oriundos de raízes de bananeira “Prata Anã”. Germinação das sementes em folhas de papel (Germitest) umedecidas com água destilada (A). Amostras representativas de um dos métodos de dispensa (microbiolização de semente germinada, microbiolização de semente sem germinação ou rega no sulco) para os cinco isolados mais a testemunha (B).