



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013  
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

**RIZOBACTÉRIAS E A PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE MUDAS DE ALFACE**

Paula Morgani Souza **Figueiredo**<sup>1a</sup>; Lidia dos Passos **Lima**<sup>c</sup>, Matheus Aparecido Pereira **Cipriano**<sup>c</sup>; Adriana Parada Dias da **Silveira**<sup>b</sup>, Sueli dos Santos **Freitas**<sup>b</sup>;

<sup>1</sup> Instituto Agrônômico

Nº 13129

**RESUMO** - A necessidade de obter mudas saudáveis e evitar a perda de culturas por doenças é uma das principais preocupações dos produtores de alface. O uso de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas pode ser uma alternativa bem sucedida para aumentar a produção agrícola. As RPCPs produzem metabólitos que estimulam o crescimento da planta, destacando-se o HCN e indóis, e que são capazes de solubilizar fosfato. Além disso, exercem papel fundamental no controle biológico, já que produzem antibióticos e sideróforos que inibem o crescimento de patógenos, resultando em produtos mais saudáveis e sem o uso de agrotóxicos. Pseudomonas, principalmente as do grupo fluorescente, já vêm sendo estudadas no cultivo de alimentos, mas pouco se sabe sobre sua ação específica, uma vez que beneficiam mudas de hortaliças, como a alface. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi verificar se isolados de Pseudomonas spp. produzem indóis, HCN e/ou solubilizam fosfato que beneficiem a planta com a qual interagem em testes *in vitro* e avaliar rizobactérias em mudas de alface, em testes em casa de vegetação.

**Palavras-chaves:** Rizobactérias, *Pseudomonas*, alface, metabólitos

<sup>a</sup>Bolsista CNPq; Graduação em Ciências Biológicas, paulamorgani@hotmail.com; <sup>b</sup>Orientador; <sup>c</sup>Colaborador



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013  
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

**ABSTRACT** - The need for healthy seedlings and prevent loss of crops due to diseases is a major concern for producers of lettuce. The use of plant growth-promoting rhizobacteria can be a successful alternative to increase agricultural production. The PGPRs produce metabolites which stimulate plant growth, HCN and standing out indoles, and are able to solubilize phosphate, besides exerting role in biological control, since they produce siderophores and antibiotics which inhibit the growth of pathogens, resulting in more products healthy and without the use of pesticides. *Pseudomonas*, especially the fluorescent group, have been studied in growing food, but little is known about their action benefiting seedlings of vegetables, such as lettuce. Thus, the aim of this study was to determine whether isolates of *Pseudomonas* spp. produce indoles, HCN and / or solubilize phosphate that benefit the host plant in vitro tests and evaluate rhizobacteria in lettuce seedlings in greenhouse tests.

**Key-words:** Rhizobacteria, *Pseudomonas*, lettuce, metabolites

## 1 INTRODUÇÃO

O cultivo e comercialização de alface (*Lactuca sativa*) são bem sucedidos em todo o mundo, inclusive no Brasil, principalmente no inverno, onde a produção é maior (Fernandes *et al.*, 2002). Mediante o cultivo, é imprescindível a obtenção de mudas com boa qualidade, para que se obtenham plantas saudáveis, com boa aparência e número de folhas adequado e para melhor apreciação dos consumidores (Bezerra *et al.*, 2005).

A maior preocupação dos produtores de hortaliças tem sido as perdas de plantas por doenças. Uma das alternativas para se obterem plantas saudáveis é a obtenção de mudas saudáveis. Nesse contexto o uso de microrganismos benéficos como as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs) é uma alternativa viável, além de se enquadrar na busca por produtos com uso reduzido de agrotóxicos (Berg, 2009).

As rizobactérias, como o próprio nome já diz, habitam a região do solo sob influência da raiz, a rizosfera, e em alguns casos podem promover o crescimento das plantas sem estabelecer com elas relações simbióticas (Kloepper *et al.*, 1980). Dentre os gêneros de microrganismos rizosféricos estão *Bacillus*, *Azospirillum* e *Pseudomonas*. A este último pertence o grupo fluorescente. Esses microrganismos são capazes de estimular o crescimento vegetal pela disponibilidade de nutrientes para as plantas, além da solubilização de fosfato inorgânico e mineralização de fosfato orgânico e produção de outros compostos (Bhattacharyya & Jha, 2012). Rizobactérias já foram relatadas não só em alface, mas também em várias outras culturas com grande eficácia, como cebola (Harthmann *et al.*, 2010), milho (Pedrinho *et al.*, 2010), pepino (Melo



## VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

*et al.*, 1995), tomate (Peixoto, 1997), eucalipto (Mafia *et al.*, 2009), plantas cítricas (Freitas *et al.*, 2004), entre outras.

O benefício oferecido pelo uso de *Pseudomonas* spp. como RPCP ainda vem sendo pouco explorado na produção de mudas, mas já é comprovada sua eficiência no desenvolvimento de plantas. São influenciadas pelo substrato e pelo ambiente no qual se desenvolveram, principalmente na rizosfera (Freitas *et al.*, 2004). A promoção de crescimento pode ser desencadeada pela produção de fitormônios como o ácido indol-acético, além de produzir compostos voláteis, como o ácido hidrocianídrico (HCN), que atua no controle biológico de fitopatógenos (Beyeler *et al.*, 1999).

O objetivo deste trabalho foi verificar se isolados pertencentes ao grupo fluorescente do gênero *Pseudomonas* produzem indóis, HCN e/ou solubilizam fosfato, e avaliar o efeito dessas rizobactérias em mudas de alface, em experimentos realizados em casa de vegetação.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos *in vitro* e *in vivo* foram realizados com isolados de rizobactérias pertencentes à coleção de microrganismos do Instituto Agrônomo, em Campinas (SP).

### 2.1 Testes *in vitro*

Foram realizados testes para verificar a capacidade de produzir metabólitos que podem ser benéficos às plantas. Para o teste de produção de ácido cianídrico (HCN), a metodologia utilizada foi a descrita por Bakker & Schippers (1987), onde a produção do ácido é visualizada pela mudança de cor do papel filtro de amarelo para laranja. Já para o teste de produção de indóis, o método utilizado foi o descrito por Bric *et al.* (1991), onde a formação de um halo rosado em volta da colônia caracteriza o isolado como produtor. Para avaliar a capacidade de solubilizar fosfato, foi utilizada a metodologia proposta por Katznelson & Bose (1959), onde os isolados com essa capacidade apresentam halo transparente ao redor da colônia.

### 2.2 Teste *in vivo*

As suspensões bacterianas utilizadas como inóculo foram obtidas da seguinte forma: os isolados bacterianos foram mantidos em meio de cultura B de King líquido, por 24 horas, para multiplicação do inóculo. Depois as suspensões bacterianas foram centrifugadas e transferidas para solução de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ . A estimativa do número de células bacterianas contidas na suspensão foi feita pela contagem do número de unidades formadoras de colônias – UFCs.



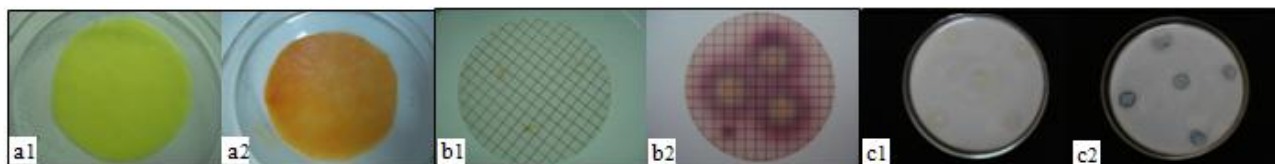
Produção de mudas: sementes de alface crespa (cv. Verônica) foram semeadas em bandejas com 200 células, em substrato comercial. Após 7 dias, inocularam-se 4 mL da suspensão bacteriana de diferentes isolados de rizobactérias em cada célula. Entre 15-20 dias após a inoculação, as mudas de alface foram colhidas. As raízes foram separadas da parte aérea depois de lavadas; ambas as partes foram pesadas para obtenção de massa de matéria fresca.

Os experimentos em casa de vegetação foram divididos em quatro experimentos distintos, sendo que no primeiro foram testados cinco isolados (LP16, LP17, LP22, LP25 e LP47). No segundo experimento, foram testados dez isolados (MP1, M2, M4, M5, M14, M15, M16, M17, M23 e M32). No terceiro experimento, foram oito isolados testados (Ps871B, PsC13, 136RN, E21G1, Ps141A, Ps51A, Ps21A, Ps60B). No quarto experimento, foram testados sete isolados (M23, M32, M39, M41, M42, M44, M45). O delineamento adotado foi o inteiramente casualizado com cinco repetições, com parcelas compostas por cinco plantas. Cada experimento continha um controle que constituído por plantas sem inóculo. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas por meio do teste de Skott-Knott a 5 % de probabilidade.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Testes *in vitro*

Esses testes qualitativos indicam a produção ou não dos metabólitos (Tabela 1). A produção de HCN pelas rizobactérias, visualizado por mudar a cor do papel de filtro (Figura 1- a2) pode inibir o crescimento de patógenos e assim promover o crescimento das plantas (Luz, 1996). A produção de indóis, caracterizado pela formação de um halo avermelhado na membrana (Figura 1- b2), nos testes *in vitro*, pode estimular o crescimento de raízes e caules, pelo alongamento de células recém-formadas nos meristemas (Taiz & Zeiger, 2010). Já no teste de solubilização de fosfato, os isolados com essa característica (Figura 1-c2) podem aumentar o crescimento das plantas, *in vivo*, uma vez que torna esse elemento disponível (Taiz & Zeiger, 2010).



**Figura 1.** Ausência (a1) e produção (a2) de HCN; ausência (b1) e produção de Indóis (b2); isolados que não solubilizam (c1) e isolados que solubilizam fosfato (c2)



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013  
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

**Tabela 1.** Testes de produção (+) ou não (-) de metabólitos por isolados de *Pseudomonas* spp.

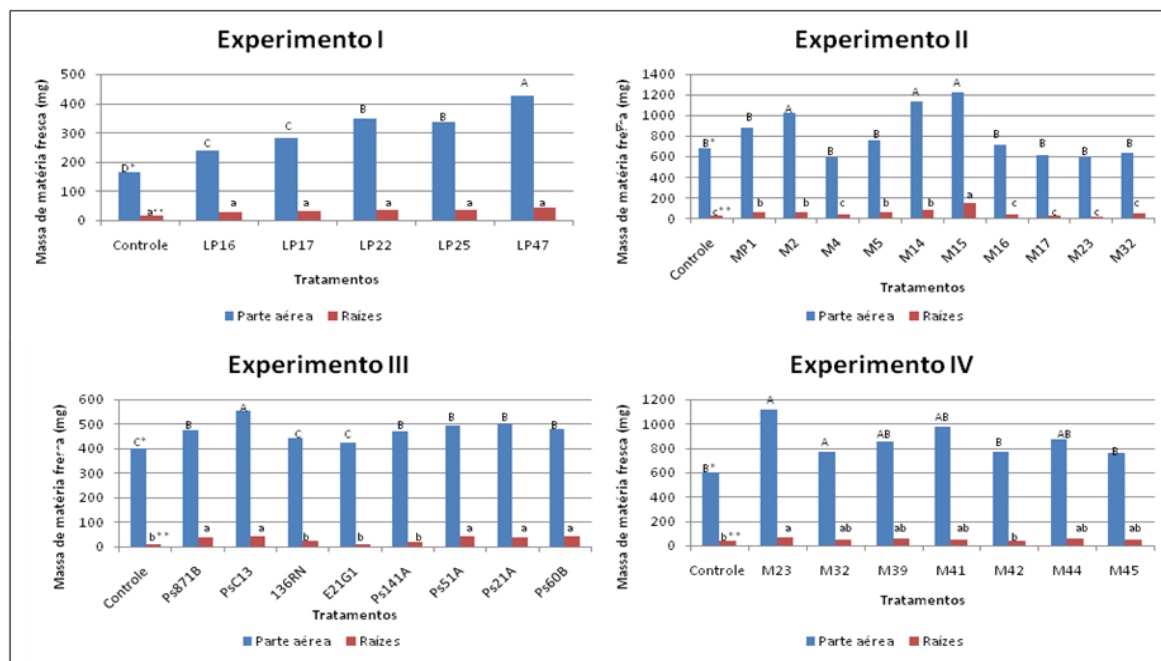
Isolado	HCN	Indóis	Solub. Fosfato	Isolado	HCN	Indóis	Solub. Fosfato
LP16	+	+	-	M32	-	-	+
LP17	+	-	+	M39	-	-	+
LP22	+	-	+	M41	-	+	+
LP25	+	-	+	M42	-	-	-
LP47	+	+	+	M44	-	-	-
MP1	+	-	-	M45	-	+	+
M2	+	-	+	Ps51A	-	+	+
M4	-	-	-	Ps871B	+	+	+
M5	-	-	-	PsC13	-	+	+
M14	-	+	-	136RN	+	+	+
M15	-	-	+	E21G1	-	-	+
M16	-	+	+	Ps21A	-	+	+
M17	-	+	+	Ps60B	+	-	+
M23	-	+	-	Ps141A	-	+	+

### 3.2 Testes *in vivo*

De acordo com a figura 2, é possível observar as diferenças de promoção de crescimento de diversos isolados, comparados com o tratamento controle. No experimento I, todos os isolados (LP16, LP17, LP22, LP25 e LP47) promoveram crescimento da parte aérea, mas não houve diferença de nenhum tratamento para a raiz.

Já no experimento II, apenas os isolados M2, M14 e M15 promoveram crescimento de toda a planta, tanto da parte aérea quanto da raiz, enquanto os tratamentos MP1 e M5 apresentaram crescimento somente na parte radicular. Os outros isolados testados (M4, M16, M17, M23 e M32) não se diferenciaram da testemunha neste experimento, de acordo com a análise estatística. No experimento III, os isolados que se destacaram na promoção de crescimento foram o Ps871B, PsC13, Ps51A, Ps21A e Ps60B, havendo diferença de massa de matéria fresca da parte aérea e das raízes das mudas de alface, diferente do tratamento Ps141A, que apenas resultou em crescimento da parte aérea. Os isolados 136RN e E21G1 mostraram-se iguais ao tratamento controle ao serem analisados estatisticamente.

No quarto e último experimento, somente o isolado M23 se apresentou como promotor de crescimento da planta inteira, já que é possível observar a diferença de matéria fresca entre esse isolado e o controle. O isolado M32 também resultou em diferença no crescimento da planta, mas somente na parte aérea. Os demais tratamentos (M39, M41, M42, M44 e M45) não apresentaram nenhuma diferença em relação ao peso da planta testemunha.



**Figura 2.** Massa de matéria fresca (mg) de mudas de alface cultivadas bandejas com substrato comercial, tratadas com isolados de rizobactérias, do gênero *Pseudomonas*. \* Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5 % de probabilidade.

Sendo assim, é possível sugerir que os isolados Ps871B, PsC13, Ps51A, Ps21A e Ps60B apresentaram diferenças em comparação com o controle por serem produtores de indóis, característica essa observada também em trabalho realizados por Rosas *et al.* (2009).

Dos 28 isolados testados em experimentos *in vitro* e *in vivo*, 24 são produtores de metabólitos benéficos ao desenvolvimento de plantas de alface e 18 promoveram crescimento da parte aérea e/ou das raízes de alface. Esses metabólitos podem ser produzidos por diferentes espécies de rizobactérias e podem beneficiar o desenvolvimento de diversas culturas entre elas a alface (Lucy, *et al.*, 2004; Henkes *et al.*, 2011).

#### 4 CONCLUSÃO

- Os isolados pertencentes ao grupo fluorescente do gênero *Pseudomonas* são capazes de produzir indóis, HCN e solubilizar fosfato;
- Os isolados testados, pertencentes à coleção de rizobactérias do Laboratório de Microbiologia do Solo, são capazes de promover o crescimento de mudas de alface.



## 5 AGRADECIMENTOS

Ao PIBIC-CNPq pela bolsa concedida e ao IAC, pela oportunidade de estágio.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAKKER, A.W.; SCHIPPERS, B. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction an *Pseudomonas* spp. Mediated plant growth-stimulation. **Soil Biology and Biochemistry**, v.19, p.451-457, 1987.

BHATTACHARYYA, P.N.; JHA, D.K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World J. Microbiology Biotechnology**, v. 28, p.1327-1350, 2012.

BERG, G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.84, p.11-18, 2009.

BEZERRA NETO, F.; ROCHA, R.H.C.; ROCHA, R.C.C.; NEGREIROS, M.Z.; LEITÃO, M.M.V.B.R.; NUNES, G.H.S.; ESPÍNOLA SOBRINHO, J.; QUEIROGA, R.C.L.F. Sombreamento para produção de mudas de alface em alta temperatura e ampla luminosidade. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.23, n.1, p.133-137, jan.-mar. 2005.

BRIC, J.M.; BOSTOCK, R.M.; SILVERSTON, S.E. Rapid in situ assay for indolacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. **Applied an Environmental Microbiology**, v.57, p.535-538, 1991.

COELHO, L.F.; FREITAS, S.S.; MELO, A.M.T.; AMBROSANO, G.M.B. Interação de bactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas* e de *Bacillus* spp. com a rizosfera de diferentes plantas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.31, p. 1413-1420, 2007.

DE MELO, L.S.; VALARINI, P.J. Potencial de Rizobactérias no Controle de *Fusarium solani* (Mart) Sacc. em pepino (*Cucumis sativum* L.). EMBRAPA, março-agosto, 1995.

FERNANDES, A.A.; MARTINEZ, H.E.P.; PEREIRA, P.R.G.; FONSECA, M.C.M. Produtividade, acúmulo de nitrato e estado nutricional de cultivares de alface, em hidroponia, em função de fontes de nutrientes. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 2, p. 195-200, junho 2.002.

FREITAS, S.S.; MELO, A.M.T.; DONZELI, V.P. Promoção de crescimento de alface por rizobactérias. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, n.1, p.61-70, 2003.

FREITAS, S.S.; VILDOSO, C.I.A. Rizobactérias e promoção do crescimento de plantas cítricas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 28:987-994, 2004.

HARTHMAN, O.E.L.; MÓGOR, A.F.; FILHO, J.A.W.; LUZ, W.C. Rizobactérias no crescimento e produtividade da cebola. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.2, p.462-465, fev.2010.

HENKES, G. J.; JOUSSET, A.; BONKOWSKI, M.; THORPE, M. R.; SCHEU, S.; LANOUE, A.; SCHURR, U.; RÖSE, U. S. R. *Pseudomonas fluorescens* CHA0 maintains carbon delivery to *Fusarium graminearum*-infected roots and prevents reduction in biomass of barley shoots through systemic interactions. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p.4337-4344, 2011.

KATZNELSON, H. & BOSE, B. Metabolic activity and phosphate dissolving capability of bacterial isolates from wheat roots, rhizosphere, and non rhizosphere soil. **Canadian Journal of Microbiology**, v.5, p.79-85, 1959.

KLOEPPER, J.W., LEONG, J.; TEINZ, M.; SCHROTH, M.N. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth promoting rhizobacteria. **Nature**, v.286, p.885-886, 1980.

LUCY, M.; REED, E.; GLICK, B. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.86, p.1-25, 2004.



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013  
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

LUZ, W. C. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e de bioproteção. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.4, p.1-50, 1996.

MAFIA, R.G.; ALFENAS, A.C.; MAFFIA, L.A.; FERREIRA, E.M.; BINOTI, D.H.B.; MAFIA, G.M.V. Plant growth promoting rhizobacteria as agents in the biocontrol of eucalyptus mini-cutting rot. **Tropical Plant Pathology**, v.34, 1, 010-017, 2009.

PEDRINHO, E.A.N.; JÚNIOR, R.F.G.; CAMPANHARO, J.C.; ALVES, L.M.C.; LEMOS, E.G.M. Identificação e avaliação de rizobactérias isoladas de raízes de milho. **Bragantia**, Campinas, v.69, n.4, p.905-911, 2010.

PEIXOTO, A.R. Controle biológico da murcha bacteriana do tomateiro, por *Pseudomonas* spp. fluorescentes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.27, n.1, p.153-160, 1997.

ROSAS, S.B.; AVANZINI, G.; CARLIER, E.; PASLUOSTA, C.; PASTOR, N.; ROVERA, M. Root colonization and growth promotion of wheat and maize by *Pseudomonas aurantiaca* SR1. **Soil Biology & Biochemistry**, v.41, p,180201806, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; **Fisiologia Vegetal**. A água e as células vegetais. Artmed, 4ª edição, 2010.