

# Visualização *in vitro* da colonização de raízes por rizobactérias

Brigida P. V. de Queiroz<sup>1</sup>; Carlos I. Aguilar-Vildoso<sup>2</sup>; Itamar S. Melo<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Centro Universitário Salesiano de São Paulo, Liceu Coração de Jesus, Rua Dom Bosco, 100 – 13466-440, Americana-SP, Brasil; <sup>2</sup>Allelyx Applied Genomics, Techno Park, Km 104 Rod. Anhanguera, R. James Clerk Maxwell 320, 13069-380, Campinas, SP; <sup>3</sup>Embrapa Meio Ambiente, CP-69 - 13820-000, Jaguariúna-SP, Brasil – Bolsista do CNPq. <itamar@embrapa.cnpma.br>  
Data de chegada: 13/12/2001. Aceito para publicação em: 07/06/05.

0824

## ABSTRACT

Queiroz, B. P. V.; Aguilar-Vildoso, C. I.; Melo, I. S. *In vitro* visualization of colonization of roots by rhizobacteria. *Summa Phytopatologica*, v. 32, p. 95-97, 2006.

For *in vitro* colonization to be quickly verified, substrate transparency is important. With this objective, a simple method was modified and the visualization of rhizobacteria in the roots was correlated to their colonization via scanning electron microscopy (SEM). Seeds of *Citrus limonia* Osbeck were inoculated and monitored in glass tubes with different substrates (Agar-Agar, Agar Noble and Phytigel). Seven rhizobacteria strains were evaluated, and an isolate of *Escheri-*

*chia coli* DH5a was used as the negative control. Phytigel allowed a clearer visualization of the colonization along the roots by the bacteria and a higher sensibility for the confirmation of the rhizobacteria. Roots that presented turbidity around the agar exhibited an efficient surface colonization when observed in high magnification. This method showed to be a very good tool to study the root colonization via SEM.

Keywords: *Citrus limonia*, rhizobacteria, root colonization.

## RESUMO

Queiroz, B. P. V.; Aguilar-Vildoso, C. I.; Melo, I. S. Visualização *in vitro* da colonização de raízes por rizobactérias. *Summa Phytopatologica*, v. 32, p. 95-97, 2006.

É proposto nesse trabalho a utilização do substrato phytigel para a germinação de sementes bacterizadas e visualização de colônias bacterianas. Sementes de limoeiro cravo (*Citrus limonia* Osbeck) foram inoculadas e monitoradas com rizobactérias utilizando-se tubos de ensaio contendo diferentes substratos para germinação de sementes, quais sejam: Ágar-Ágar, Ágar Noble e Phytigel, onde foram avaliados sete isolados rizobacterianos além de um isolado de *Escherichia coli* DH5a como controle negativo. Verificou-se que o Phytigel permitiu uma vi-

sualização nítida da colonização ao longo das raízes, pelas bactérias, como também proporcionou ser uma boa ferramenta para estudar a colonização via microscopia de varredura. As rizobactérias que melhor colonizaram as raízes e que apresentaram turbidez no ágar, ao seu redor, mostraram-se aderidas à superfície radicular, com colonização eficiente em diferentes sítios ao longo das raízes, quando observadas em alta magnificação.

Palavras-chave: Rizobactérias, *Citrus limonia*, Colonização radicular.

Vários métodos *in vitro* têm sido desenvolvidos para se observar a colonização de raízes por bactérias antagonicas como, por exemplo, o uso de tubos de ensaio com solo (4) e placas com solo, ágar e papel de filtro (2). Entretanto, o emprego do Ágar-ágar (3) ou do Ágar Noble (1) permite o monitoramento visual das rizobactérias, principalmente no que se refere a sua habilidade de sobrevivência utilizando apenas os exsudatos radiculares.

Desta forma, estas metodologias facilitam a seleção de um grande número de isolados rizobacterianos. A colonização do rizoplano pode ser visualizada pela formação de uma turbidez de aspecto leitoso, que se forma ao longo das raízes, em consequência do crescimento bacteriano. Portanto, quanto mais transparente o meio, melhor a visualização da colonização. Assim sendo, os substratos citados acima apresentam uma turbidez

natural, que em certos casos, interferem na sensibilidade do teste.

O objetivo principal do presente trabalho foi comparar os substratos Phytigel (Sigma), Ágar-ágar (Difco) e Ágar Noble (Difco), quanto à visualização da colonização de raízes de limoeiro 'Cravo' (*Citrus limonia*) por rizobactérias e, desta forma, facilitar a seleção de isolados rizobacterianos por um método de triagem simples.

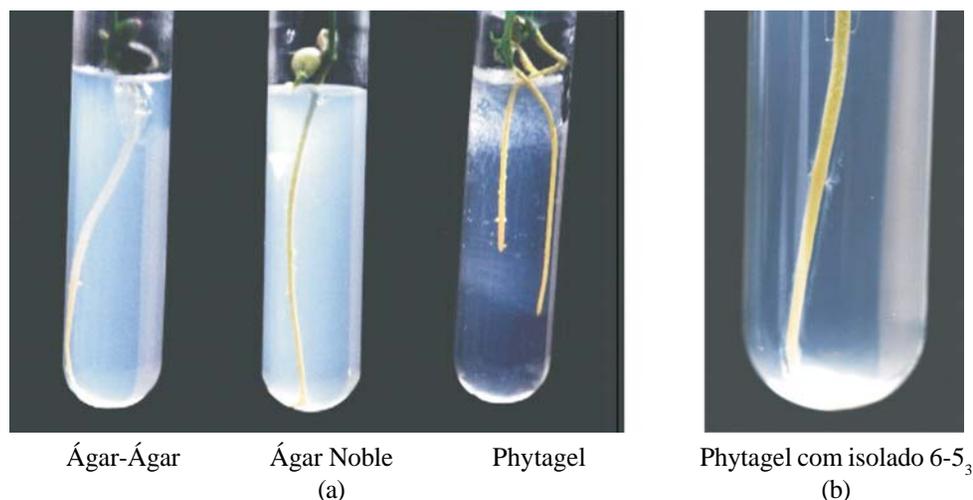
Sete isolados bacterianos (*Pseudomonas fluorescens* C1/SNa, *P. fluorescens* 2-3.1A, *P. putida* Sta. Bárbara, *Chryseobacterium* sp. 2-3.1L, *Paenibacillus polymyxa* 3-4, *Serratia marcescens* R 3-5 e *S. indologenes* 6-5.3) obtidos da rizosfera de feijoeiro, cenoura e citros, pertencente à Coleção de Culturas da Embrapa Meio Ambiente e o isolado DH5a de *Escherichia coli*, foram avaliados quanto à sua capacidade de colonizar raízes de citros.

Sementes de limoeiro "cravo", desinfestadas superficialmente, foram inoculadas com uma suspensão de inóculo ( $10^7$  a  $10^8$  UFC) e, então, semeadas em tubos de ensaios contendo os seguintes substratos: Ágar Noble: água (0,8% p/v), Ágar-Ágar e Phytogel-água. Duas sementes por tubo de 150 mm comprimento por 25 mm de diâmetro foram usadas e 5 repetições por isolado bacteriano. Os tubos foram deixados em estufa a 28°C com fotoperíodo de 12 horas, e avaliados, periodicamente, considerando-se os seguintes parâmetros: germinação das sementes, presença de pêlos radiculares, tamanho e comprimento da raiz e colonização radicular. Aos 26º dia de incubação, os substratos foram observados com relação a sua transparência e a presença das bactérias ao redor do sistema radicular. A comprovação da colonização se deu via Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) modelo Leo 982. Para isto, segmentos de raízes foram fixados em glutaraldeído 2% em tampão fosfato de sódio 0,1M, desidratados por uma série alcoólica (15, 30, 60, 70, 95 e 100%),

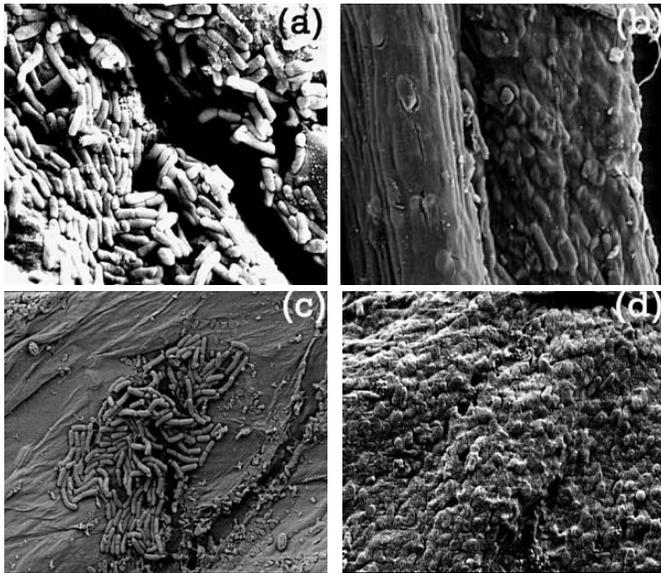
secos ao ponto crítico e metalizados com fina camada de ouro.

Em todos os substratos utilizados foi possível a visualização da colonização das raízes (Figura 1). No entanto, os substratos utilizados, Ágar-ágar e Ágar Noble, por apresentarem uma turbidez natural, prejudicaram a visualização da colonização. Além disso, o Ágar Noble apresenta o inconveniente de ser oneroso. O Phytigel teve uma maior sensibilidade na detecção da bactéria no sistema radicular, onde se pôde, visualmente, ou com auxílio de microscópio estereoscópico detectar o crescimento bacteriano ao longo das radículas. Este é um meio extremamente transparente que facilita a triagem rápida de um grande número de linhagens, com potencial de colonizar o sistema radicular.

Considerando os resultados em Phytigel, *P. putida* (Sta. Bárbara) e *Chryseobacterium* sp. (2-3.1L) apresentaram uma colonização abundante e *P. fluorescens* (C1/SNa e 2-31A), *Serratia marcescens* (R 3-5), *P. fluorescens* (3-6) e *Paenibacillus polymyxa* 3-4 uma colonização intermediária. *Escherichia coli* não apresentou esta característica colonizadora ou estava abaixo do limite de detecção pela metodologia aqui utilizada. De fato, bactérias do grupo das *Pseudomonas fluorescentes* têm se destacado como potentes colonizadoras da rizosfera. A ausência de qualquer fonte de carbono disponível nos substratos utilizados proporciona uma seleção de rizobactérias com capacidade de utilização dos exsudatos radiculares, permitindo, assim, selecionar aquelas que são atraídas e/ou que metabolizam os exsudatos radiculares. Aquelas linhagens que apresentam abundante crescimento nas raízes, ao serem visualizadas por MEV, apresentaram aderidas e com forte colonização de diversos microsítios (Figura 2). Os resultados indicam que houve uma correlação entre a visualização da colonização da rizosfera via tubos de ensaio e do rizoplano via MEV. Desta forma, a seleção de colonizadores poderá ser simples, rápida e com baixos custos.



**Figura 1.** Aspecto das raízes de limoeiro 'Cravo' (*Citrus limonia*) colonizadas por rizobactérias em diferentes substratos, 26 dias após a inoculação das sementes. (a) Ágar-ágar com isolado 6-5.3 de *Serratia indologenes*; Ágar Noble, isolado 2-3.1L de *Chryseobacterium* sp e Phytigel isolado 2-3.1A de *P. fluorescens*. (b) Detalhe da colonização, ao longo da raiz, do isolado 6-5.3 de *Serratia indologenes* no substrato Phytigel.



**Figura 2.** Microscopia Eletrônica de Varredura: (a) Células de *Paenibacillus polymixa* 3- 4 aderidas à coifa de raízes de citros (5750,10 kv 5 $\mu$ m); (b) isolado 2-3 1L de *P. fluorescens* mostrando uma densa camada mucilaginosa (5.000x, 5kv, 5 $\mu$ m) (c) isolado 2-3 1L de *Chryseobacterium* sp agrupados em colônias no sistema radicular (5.000x, 5kV, 5 $\mu$ m). (d) isolado C1-S/Na de *P. fluorescens* sob uma camada mucilaginosa (390x, 15kV, 100 $\mu$ m).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Habe, M.H.; Uesugi. 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.
2. Randhawa, P.S.; Schaad, N.W. A seedling bioassay chamber for determining bacterial colonization and antagonism on plant roots. **Phytopathology**, St. Paul v.75, n.3, p.254-259, 1985.
3. Romeiro, R.S.; Takatsu, A.; Uesugi, C.H.; Moura, A.B.; Silva, H.S.A. Um método simples para seleção de rizobactérias com capacidade de promover colonização de raízes e sua implicação na indução de resistência sistêmica a enfermidades e na promoção do crescimento de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.24, n.1, p. 255, 1999. (Resumo 57)
4. Scher, F.M.; Ziegler, J.S.; Kloepper, J. A method for assessing the root-colonizing capacity of bacteria on maize. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.30, p.151-157, 1984.