

## Isolamento e caracterização de bactérias promotoras de crescimento em morangueiro <sup>(1)</sup>.

**Bianca Salete Branco<sup>(2)</sup>; Marcos Roberto Dobler Stroschein<sup>(3)</sup>; Murilo Dalla Costa<sup>(4)</sup>; Gilberto Dalagnol<sup>(4)</sup>; Silmar Primieri<sup>(3)</sup>; Rosane Schenkel de Aquino<sup>(5)</sup>**

<sup>(1)</sup> Trabalho executado com recursos do Instituto Federal de Ciência e Tecnologia de Santa Catarina.

<sup>(2)</sup> Acadêmico do Curso Técnico em Biotecnologia; Instituto Federal de Santa Catarina, Lages, Santa Catarina.

<sup>(3)</sup> Docente do Curso Técnico em Fruticultura, Instituto Federal de Santa Catarina, Urupema, Santa Catarina.

<sup>(4)</sup> Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri)- Rua João José Godinho, s/n, Bairro Morro do Posto, Caixa Postal 181, Lages - SC, CEP 88502-970

<sup>(5)</sup> Docente do Curso Técnico em Biotecnologia, Instituto Federal de Santa Catarina, Lages, Santa Catarina.

**RESUMO:** O morangueiro é cultivado em diferentes regiões do Brasil e embora seja uma cultura de importância social e econômica relevante, os custos elevados de produção é um fator limitante a exploração por agricultores familiares. Uma alternativa potencial para redução da quantidade de insumos na agricultura é o uso de bactérias promotoras de crescimento de plantas. O objetivo deste trabalho foi isolar, avaliar e selecionar bactérias promotoras de crescimento a partir de solo rizosférico e tecidos radiculares de morangueiro. Colônias bacterianas foram isoladas em meios de cultura NFB e LGI e foram caracterizadas quanto a produção de ácido indolacético e solubilização de fosfato *in vitro*. Todas as bactérias isoladas apresentaram características diazotróficas. A quantidade e diversidade de isolados de bactérias promotoras de crescimento foi maior no ambiente endofítico. O isolado IFSC Fa 12 possui potencial para avaliação em ensaios em casa de vegetação.

**Termos de indexação:** agricultura, fixação biológica de nitrogênio, diversidade.

### INTRODUÇÃO

O morango (*Fragaria x ananassa* Duch. ex Rozier) é cultivado em diferentes partes do mundo, incluindo regiões subtropicais, tropicais e temperadas. Essa cultura é de grande importância econômica e social em muitas regiões do Brasil, pois o consumo da fruta vem aumentando nos últimos anos e o cultivo se caracteriza pela agregação de contingente considerável de mão de obra familiar rural (Oliveira & Scivittaro, 2006). No entanto, devido aos elevados custos de produção desta cultura, muitas vezes não é considerada pelos agricultores, sendo que estratégias que visam à redução de insumos podem diminuir os custos de produção e tornar esta atividade de cultivo mais rentável e atrativa aos agricultores familiares.

Uma alternativa que vem sendo relatada para redução do uso de insumos na agricultura se dá pelo uso de bactérias promotoras de crescimento de

plantas. Tais micro-organismos, que estão naturalmente presentes na rizosfera das plantas, podem viver dentro, sobre ou em torno dos tecidos radiculares e estimular o crescimento das plantas por meio de fixação biológica de nitrogênio, biossíntese de fito-hormônios e solubilização de fosfatos, por exemplo (Lugtenberg & Kamilova, 2009). Diversas rizobactérias vêm sendo relatadas como promotoras de crescimento em plantas (Hayat et al., 2010), sendo que *Azospirillum* e *Bacillus* são os gêneros de bactérias mais encontrados em morangueiro (Tortora et al., 2011). No entanto, poucos trabalhos foram realizados no Brasil visando isolar e selecionar potenciais bactérias promotoras de crescimento do morangueiro. Assim, o objetivo deste trabalho foi isolar, avaliar e selecionar bactérias promotoras de crescimento a partir de solo rizosférico e tecidos radiculares de morangueiro.

### MATERIAL E MÉTODOS

Dez amostras de plantas e solo rizosférico de morangueiro foram coletadas em área de cultivo e produção orgânica no município de Paineira, região serrana do estado de Santa Catarina (27°54'59"S 49°59'36"O, altitude 1.226 m). Após coleta, as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos e enviadas ao laboratório de Biotecnologia da Epagri Estação Experimental de Lages para serem processadas. O isolamento das bactérias promotoras de crescimento presentes no solo rizosférico e na superfície e interior das raízes foi realizado de acordo com metodologia proposta por Döbereiner et al. (1995).

Após o isolamento foi realizada a caracterização morfológica das colônias bacterianas com relação à cor, transmitância da luz e gomosidade em placas de Petri contendo meio Batata Dextrose Agar (BDA). Com base na caracterização fenotípica, foi determinada a diversidade dos isolados pelo índice de Shannon-Wiener (H'). A capacidade de fixação biológica de nitrogênio (caráter diazotrófico) foi determinada pela constatação de formação de película característica após inoculação dos isolados bacterianos nos meios de cultura NFB e LGI

(Döbereiner et al., 1995).

A produção de ácido indolacético foi avaliada de acordo com os procedimentos descritos por Asghar et al. (2002). Os isolados foram cultivados em meio de cultura NFB suplementado com 50 mg L<sup>-1</sup> de L-triptofano. Depois de 48 h, as suspensões bacterianas foram centrifugadas (10.000 rpm por 5 minutos) e alíquotas de 60 µL do sobrenadante foram transferidas a microplaca de poliestireno para reagirem com 40 µL da solução de Salkowski. Após 30 minutos, as amostras que apresentarem coloração rosa foram consideradas como positivas e de acordo com a intensidade de cor, os isolados foram divididos em três classes (baixa, média e alta produção relativa de ácido indolacético).

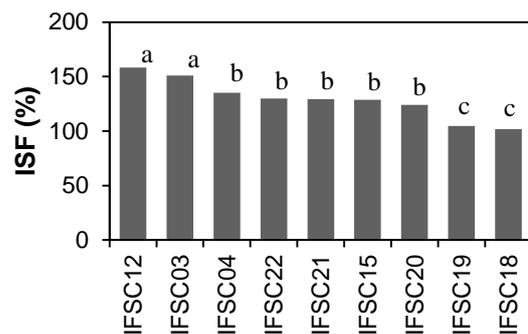
A capacidade de solubilização de fosfato foi determinada em placas de Petri contendo meio de cultura com fonte de fosfato insolúvel (glicose, 10 g L<sup>-1</sup>; extrato de levedura, 0,1 g L<sup>-1</sup>; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,25 g L<sup>-1</sup>; CaCl<sub>2</sub>, 0,1 g L<sup>-1</sup>; Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 2,5 g L<sup>-1</sup>; ágar, 15 g L<sup>-1</sup>; pH 7,2) (Nautiyal, 1999). Alíquotas de 10µL das suspensões bacterianas, com três repetições por isolado, foram transferidas à superfície do meio de cultura e as placas foram incubadas em estufa a 32°C por sete dias. A formação de um halo transparente indicou a solubilização do fosfato pelos isolados. Foram determinados os diâmetros das colônias e dos halos formados para estimar o índice de solubilização de fosfato (ISF), de acordo com a equação  $ISF (\%) = (\frac{\text{Ø colônia}}{\text{Ø halo}}) \times 100$ , na qual Ø colônia e Ø halo representam os diâmetros das colônias e do halo formado, respectivamente. Os dados de ISF foram submetidos à análise de variância (teste F) seguido de teste de separação de médias (Scott-Knott, <0,05).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos 24 isolados bacterianos que apresentaram característica de formação de película em meio de cultura NFB ou LGI, indicando a capacidade de fixação biológica de nitrogênio em meio de cultura (Tabela 1). Destas bactérias diazotróficas, 58% foram isoladas de raízes desinfestadas (endofíticos), 33% das raízes não desinfestadas (rizosféricos) e 8% foram provenientes do solo rizosférico. Resultado semelhante foi obtido por Pedraza et al. (2007), que observou um maior número de bactérias diazotróficas endofíticas presentes em raízes de plantas de morangueiro. Além disso, a caracterização de morfologia das colônias indicou variação na diversidade de bactérias presentes em cada ambiente, sendo que o ambiente endofítico apresentou a maior diversidade de micro-

organismos (H': 2,243) em comparação ao ambiente rizosférico (H': 1,733) e solo (H': 0,6931), avaliados pelo índice de Shannon.

Com relação às características de promoção de crescimento, todos os isolados foram capazes de produzir auxinas em meio de cultura, sendo que os isolados IFSC Fa 02, IFSC Fa 11, IFSC Fa 12 e IFSC Fa 23 foram os micro-organismos que apresentaram a coloração rosada mais intensa *in vitro* (Tabela 1), indicando os maiores valores de produção de equivalentes ao ácido indolacético. Os isolados IFSC Fa 12, IFSC Fa 03, IFSC Fa 04, IFSC Fa 22, IFSC Fa 21, IFSC Fa 15, IFSC Fa 20, IFSC Fa 19 e IFSC Fa 18 apresentaram a característica de solubilização de fosfato tricálcico, sendo que os isolados IFSC Fa 12 e IFSC Fa 03 foram os micro-organismos que apresentaram os maiores índices de solubilização de fosfato (Figura 1).



**Figura 1** - Índice de solubilização de fosfato (ISF%) de bactérias isoladas de plantas de morango. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

Poucos estudos foram realizados para isolamento de bactérias promotoras de crescimento em espécies de *Fragaria* e apenas recentemente algumas descobertas nessa área (Tortora et al., 2011). O isolado IFSC Fa 12 além de apresentar característica diazotrófica, foi o isolado que apresentou maior índice de solubilização de fosfato e capacidade de produção de equivalentes ao ácido indolacético, indicando que este micro-organismo tem potencial para ser avaliado em ensaios em casa de vegetação.

## CONCLUSÕES

Foi possível isolar micro-organismos promotores de crescimento de plantas de morangueiro, sendo que existe uma maior diversidade de micro-organismos no ambiente endofítico. Todas as bactérias isoladas apresentaram características



diazotróficas. O isolado IFSC Fa 12 possui potencial para ensaios em casa de vegetação.

### REFERÊNCIAS

- ASGHAR, H.N.; ZAHIR, Z.A.; ARSHAD, M.; KHALIQ, A. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. *Biology and Fertility of Soils*, v.35, n.4, p.231-237, 2002.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L.D.; BALDANI, J.I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília: Embrapa-SPI, 1995. 60 p.
- LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, v.63, n.1, p.541-556, 2009.
- NAUTIYAL, C.S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, v.170, n.1, p.265-270, 1999.
- OLIVEIRA, R.P.; SCIVITTARO, W.B. Desempenho produtivo de mudas nacionais e importadas de morangueiro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.28, n.3, p. 520-522, 2006.
- PEDRAZA, R.; MOTOK, J.; TORTORA, M.; SALAZAR, S.; DÍAZ-RICCI, J. Natural occurrence of *Azospirillum brasilense* in strawberry plants. *Plant and Soil*, v.295, n.1-2, p.169-178, 2007.
- HAYAT, R.; ALI, S.; AMARA, U.; KHALID, R.; AHMED, I. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology*, v.60, n.4, p.579-598, 2010.
- TORTORA, M.L.; DÍAZ-RICCI, J.C.; PEDRAZA, R.O. *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. *Archives of Microbiology*, v.193, n.4, p.275-286, 2011.

**Tabela 1** – Características morfológicas, produção de ácido indolacético (AIA) e solubilização de fosfato (SF) de bactérias diazotróficas isoladas de solo rizosférico e de raízes de plantas de morangueiro.

Isolado	Ambiente de isolamento	AIA <sup>(1)</sup>	SF <sup>(2)</sup>	Cor da colônia	Transmitância da Luz	Gomosidade
IFSC Fa 01	Endofítica	++	-	Branca	Opaca	Seca
IFSC Fa 02	Rizosférica	+++	-	Branca	Opaca	Seca
IFSC Fa 03	Rizosférica	+	+	Branca	Translúcida	Seca
IFSC Fa 04	Endofítica	+	+	Amarela	Translúcida	Gomosa
IFSC Fa 05	Endofítica	+	-	Branca	Opaca	Seca
IFSC Fa 06	Solo	+	-	Branca	Opaca	Seca
IFSC Fa 07	Endofítica	+	-	Amarela	Opaca	Gomosa
IFSC Fa 08	Solo	+	-	Branca	Translúcida	Seca
IFSC Fa 09	Endofítica	+	-	Amarela	Opaca	Gomosa
IFSC Fa 10	Rizosférica	+	-	Amarela	Opaca	Gomosa
IFSC Fa 11	Rizosférica	+++	-	Amarela	Translúcida	Gomosa
IFSC Fa 12	Endofítica	+++	+	Branca	Opaca	Seca
IFSC Fa 13	Rizosférica	+	-	Amarela	Opaca	Gomosa
IFSC Fa 14	Endofítica	++	-	Branca	Translúcida	Seca
IFSC Fa 15	Endofítica	+	+	Branca	Translúcida	Seca
IFSC Fa 16	Endofítica	+	-	Branca	Translúcida	Seca
IFSC Fa 17	Endofítica	+	-	Amarela	Opaca	Seca
IFSC Fa 18	Endofítica	+	+	Amarela	Opaca	Seca
IFSC Fa 19	Endofítica	+	+	Branca	Translúcida	Gomosa
IFSC Fa 20	Rizosférica	+	+	Branca	Translúcida	Seca
IFSC Fa 21	Rizosférica	+	+	Branca	Opaca	Seca
IFSC Fa 22	Endofítica	+	+	Amarela	Translúcida	Seca
IFSC Fa 23	Endofítica	+++	-	Amarela	Opaca	Gomosa
IFSC Fa 24	Rizosférica	+	-	Branca	Translúcida	Gomosa

<sup>(1)</sup> AIA: Ácido indolacético.

<sup>(2)</sup> Solubilização de Fosfato.