

Bactérias promotoras de crescimento no desenvolvimento de *Heliconia psittacorum* L.f.

Maria Herbênia Lima Cruz Santos¹, Rosa de Lima Ramos Mariano², Terezinha Rangel Camara², Arnóbio Gonçalves de Andrade², Lilia Willadino² e Giuseppina Pace Pereira Lima^{3,4}

Recebido: 13.12.2004; aceito: 03.06.2005

ABSTRACT - (Plant growth-promoting bacteria on *Heliconia psittacorum* L.f.). To study the effect of bacterial isolates on *Heliconia psittacorum* growth propagative units were bacterized with endophytic (ENF1, ENF5 and ENF6) and epiphytic (C22, C25, C210, C240, IF82 and R14) bacteria. After bacterization the propagative units were placed into black polyethylene bags for seven days to stimulate lateral shoot formation. Half of the bacterized material was planted in pots on greenhouse. The others units were used to obtain explants for *in vitro* cultivation. In greenhouse, ENF1 and C22 isolates increased the plant biomass production. The isolates C210 and IF82 reduced growth. For the *in vitro* culture, shoot tips from the rhizome lateral buds were isolated and inoculated in MS medium with adenine sulfate, IAA (indole-3-acetic acid) and BAP (6-benzylaminopurine). The efficiency of isolates on the control of contaminations during the culture *in vitro* was also evaluated. Both treatments, chemical and biological, weren't efficient to control bacterial *in vitro* contaminations.

Key words: antibiotic, plant growth-promoting bacteria, shoot tips

RESUMO - (Bactérias promotoras de crescimento no desenvolvimento de *Heliconia psittacorum* L.f.). Objetivando o estudo de isolados dos efeitos bacterianos no desenvolvimento de plantas de *Heliconia psittacorum*, unidades propagativas foram tratadas com bactérias endofíticas (ENF1, ENF5 e ENF6) e epifíticas (C22, C25, C210, C240, IF82 e R14) e acondicionadas em saco de polietileno preto, durante sete dias para estimular o desenvolvimento de gemas laterais. Metade do material bacterizado foi utilizado para o cultivo em casa de vegetação e o restante, para obtenção de explantes no cultivo *in vitro*. Em casa de vegetação, os isolados ENF1 e C22 mostraram tendência de aumento de biomassa enquanto que, os isolados C210 e IF82 reduziram o crescimento. Para o cultivo *in vitro* foram extraídos ápices caulinares a partir de gemas laterais de rizoma e inoculados em meio MS, com sulfato de adenina, AIA (ácido indolacético) e BAP (6-benzilaminopurina). Além destes tratamentos, avaliou-se a eficiência dos isolados no controle de contaminações durante o cultivo *in vitro*. Ambos os tratamentos, químico como o biológico, foram ineficazes no controle das contaminações bacterianas *in vitro*.

Palavras-chave: antibiótico, ápices caulinares, bactérias endofíticas

Introdução

O Brasil possui grande contingente de espécies nativas de flores e plantas ornamentais tropicais, como as orquídeas, cactos, bromélias e helicônias. As helicônias apresentam brácteas de colorido brilhante, são muito decorativas e utilizadas, principalmente, em projetos de jardinagem e como flores de corte. Suas hastes possuem boa resistência ao transporte e longa durabilidade após a colheita, características que têm contribuído para o aumento de sua comercialização nos mercados nacional e internacional (Castro 1993).

Um dos problemas para o cultivo de helicônias no Brasil, principalmente na região Nordeste, é a dificuldade de obtenção de mudas em escala comercial e a demanda por novas espécies, ocasionando a importação. O material importado, quando não submetido à quarentena, pode contribuir para a introdução de patógenos, os quais podem infectar espécies nativas ainda não exploradas e outras espécies hortícolas de interesse comercial. De acordo com Sewake & Uchida (1995), embora a helicônia apresente certa resistência a doenças, a propagação vegetativa e o intercâmbio de germoplasma sem os

1. Universidade do Estado da Bahia, Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais (DTCS), Campus III, Avenida Edgard Chastinet Guimarães s.n., São Geraldo, 49800-000 Juazeiro, BA, Brasil
2. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. D. Manoel de Medeiros, s.n., Dois Irmãos, 52171-900 Recife, PE, Brasil
3. Universidade Estadual Paulista, Departamento de Química e Bioquímica, Caixa Postal 510, 18618-000 Botucatu, SP, Brasil
4. Autor para correspondência: gpplima@ibb.unesp.br

cuidados de quarentena, podem favorecer a disseminação de fitopatógenos, entre campos de produção.

Técnicas de micropropagação, a partir do estabelecimento *in vitro*, podem aumentar a oferta de diferentes espécies, através da regeneração de plantas com bom estado fitossanitário, mantendo a fidelidade genética pela produção de clones (González 1998). No entanto, o estabelecimento de explantes de helicônia tem sido dificultado devido às freqüentes contaminações bacterianas (Atehortua *et al.* 1999).

Bactérias endofíticas, as quais convivem com a planta em seu hábitat natural, durante a micropropagação podem competir com os explantes devido ao ambiente favorável para seu crescimento. Desta forma, torna-se necessário buscar alternativas para o seu controle, incluindo o incremento das medidas de assepsia e o cultivo de ápices caulinares, associado ao uso de controle químico ou biológico (Capó 1998). Bactérias promotoras de crescimento, conhecidas na literatura como “plant growth-promoting rhizobacteria” (PGPR) ou “rhizobacteria promotora de crescimento de plantas” (RPCP), colonizam diferentes órgãos das plantas e exercem efeitos benéficos sobre as mesmas, podendo promover aumentos na taxa de germinação de sementes, no desenvolvimento de órgãos, na produção de flores e no rendimento das culturas em casa de vegetação e no campo (Amorim & Melo 2002, Dey *et al.* 2004). As interações na rizosfera têm um papel importante na transformação, mobilização e solubilização, entre outros, de um ‘pool’ de nutrientes no solo e sua absorção pelas plantas cultivadas com a finalidade de aumento de produtividade (Dey *et al.* 2004).

Durante a micropropagação, a bacterização de plantas com RPCP tem sido recomendada para aumentar tolerância a estresses bióticos e abióticos, induzindo alterações no metabolismo e do desenvolvimento vegetal. Essas alterações podem se traduzir pela promoção de crescimento e aumento da resistência a patógenos no transplante (Novak 1998, Srinath *et al.* 2003). Este trabalho teve o objetivo de estudar o efeito de diferentes isolados de RPCP no crescimento de plantas de *Heliconia psittacorum* L.f., cultivadas em casa de vegetação e sobre o crescimento e desenvolvimento *in vitro* de gemas extraídas de unidades propagativas bacterizadas. Avaliou-se também a eficiência dos isolados no controle de contaminações durante o cultivo *in vitro*.

Material e métodos

Unidades Propagativas de *Heliconia psittacorum* - Plantas de helicônia, provenientes das margens do Açude do Prata no Horto Florestal de Dois Irmãos, Recife-PE, tiveram os rizomas seccionados e separados em unidades propagativas (UPs). As UPs consistiram de segmentos de rizoma com aproximadamente 7 cm de comprimento, contendo gemas, unidas a uma porção do pseudocaule medindo em torno de 20 cm de comprimento.

Obtenção e multiplicação das bactérias endofíticas e epifíticas - Os isolados bacterianos endofíticos (ENF1, ENF5, ENF6) e epifíticos (C22, C25, C210, C240, IF82, R14) foram obtidos da coleção de bactérias do laboratório de Fitobacteriologia da UFRPE (tabela 1) sendo provenientes de diferentes órgãos dos seguintes hospedeiros: couve (*Brassica oleracea* var. *acephala* L.), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) e inhame (*Dioscorea cayennensis* Lam.). As bactérias endofíticas foram isoladas de sementes de feijão e as epifíticas de folhas de couve, inhame e repolho.

Bacterização de unidades propagativas de helicônia - As suspensões bacterianas foram preparadas adicionando-se água destilada esterilizada (ADE) sobre as culturas bacterianas após 24 horas de cultivo em placa de Petri. A concentração das suspensões foi ajustada em fotocolorímetro com filtro de 580 nm, para 0,52 de absorvância. A bacterização dos rizomas foi feita pela imersão por 30 minutos nas suspensões, com adição de 1 gota de Tween a 80% em 2 litros de suspensão. As testemunhas foram imersas em ADE pelo mesmo período de tempo. Os rizomas

Tabela 1. Isolados de bactérias utilizados para bacterização de unidades propagativas de helicônia.

Isolados	Hospedeiro	Hábitat	Identificação
ENF1	Feijão (semente)	Endofítica	*
ENF5	Feijão (semente)	Endofítica	*
ENF6	Feijão (semente)	Endofítica	*
C22	Couve (folha)	Epifítica	<i>Bacillus</i> sp.
C25	Couve (folha)	Epifítica	<i>Bacillus</i> sp.
C210	Couve (folha)	Epifítica	<i>B. cereus</i>
C240	Couve (folha)	Epifítica	<i>B. cereus</i>
IF82	Inhame (folha)	Epifítica	<i>B. subtilis</i>
R14	Repolho (folha)	Epifítica	<i>B. subtilis</i>

* Não identificadas

bacterizados e as testemunhas foram postos para secar sobre papel toalha, em condições de laboratório a 26 ± 2 °C, por 24 horas, seguindo-se do acondicionamento em sacos de polietileno preto a 25 ± 2 °C, durante sete dias, para estimular o desenvolvimento de gemas laterais. Decorrido este tempo, as UPs foram separadas em dois grupos, sendo um grupo utilizado para plantio em casa de vegetação e o outro para o cultivo *in vitro*.

Cultivo em casa de vegetação - As UPs foram plantadas em sacos de polietileno preto com dimensão de 20×26 cm, contendo 1 kg de solo não esterilizado e, colocadas sobre bancadas, em casa de vegetação.

O crescimento das plantas foi acompanhado por três meses, durante os quais o solo foi mantido em capacidade máxima de retenção de água. Foram aplicados, quinzenalmente, aproximadamente 100 mL da solução completa de Hoagland (Hoagland & Arnon 1950). Ao fim desse período, foram avaliados o número de folhas, a área foliar expandida (cm²), o peso da matéria seca da parte aérea (g) e o peso da matéria seca do sistema radicular e rizoma (g).

Em seguida, foram calculados os índices de aumento para todas as variáveis avaliadas, através da fórmula proposta por Edginton *et al.* (1971): $IA = [(TR - T) / T]100$; onde: TR = valor obtido para o tratamento; T = valor obtido para a testemunha.

Em casa de vegetação, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 10 tratamentos, constituídos por nove isolados (ENF1, ENF5, ENF6, C22, C25, C210, C240, IF82 e R14) e o controle, sem bacterização, todos com seis repetições. Cada UPs constituiu uma repetição, somando um total de 60 UPs provenientes dos nove tratamentos mais o controle. As médias foram comparadas pelo Teste da Diferença Mínima Significativa (D.M.S.) em nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o pacote estatístico SANEST (Zonta & Machado 1980).

Cultivo *in vitro* de ápices caulinares - Para o cultivo *in vitro*, foram utilizados ápices caulinares, provenientes das UPs bacterizadas ou não, os quais passaram pelo seguinte processo de desinfestação: álcool a 70% durante 1 minuto, hipoclorito de sódio a 0,8% por 15 minutos e três lavagens com ADE. Em seguida, os ápices caulinares foram inoculados em meio de cultura básico MS (Murashige & Skoog 1962), sem adição de glicina e acrescido de 80 mg L^{-1} de sulfato de adenina, $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de AIA (ácido 3-indolacético), $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP (6-benzilaminopurina) e $6,0 \text{ mg L}^{-1}$

de ágar; sendo o pH ajustado para 5,8. Os tratamentos constaram de ápices caulinares bacterizados (ENF1, ENF5, ENF6, C22, C25, C210, C240, IF82 e R14) inoculados em meio de cultura sem antibiótico e ápices caulinares não bacterizados inoculados em meio de cultura contendo o antibiótico rifampicina nas concentrações (0,0; 0,1; 0,2; 0,5; $1,0 \text{ g L}^{-1}$). A rifampicina e o AIA foram esterilizados por filtração (milipore $0,22 \mu\text{m}$) sendo adicionados ao meio de cultura previamente autoclavado a 120 °C por 20 minutos.

Os explantes foram inoculados individualmente em tubos de ensaio e incubados em sala de crescimento sob temperatura de 25 ± 2 °C, permanecendo durante oito dias em câmara escura. Após esse período, o material foi submetido a fotoperíodo de 16 h, com intensidade lumínica de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. A avaliação foi realizada semanalmente, durante 30 dias, observando-se a percentagem de contaminação (presença ou ausência de bactérias no meio), desenvolvimento do explante e regeneração de plântulas.

No cultivo *in vitro*, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 14 tratamentos (ápices caulinares provenientes das UPs bacterizadas: ENF1, ENF5, ENF6, C22, C25, C210, C240, IF82 e R14, sem antibiótico e ápices caulinares provenientes de UPs não bacterizados, cultivados em meio com e sem antibiótico) e 8 repetições (cada ápice caulinar cultivado por vidro, constituiu uma repetição) e o controle, sem bacterização. As médias foram comparadas pelo Teste da Diferença Mínima Significativa (D.M.S.) em nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o pacote estatístico SANEST (Zonta & Machado 1980).

Antibiograma - A bactéria alvo foi isolada a partir de explantes contaminados provenientes de ensaio preliminar, sendo os isolados cultivados em meio de cultura NYDA (Pusey & Wilson 1984) por 48 h. A suspensão foi preparada com 0,52 de absorbância e adicionado 0,1 mL de suspensão bacteriana a 100 mL do meio de cultura, momentos antes de verter em placas de Petri. Logo após a solidificação do meio, discos contendo $300 \mu\text{g L}^{-1}$ de ácido nalidíxico, 300 mg L^{-1} de cefrodina, $150 \mu\text{g L}^{-1}$ de eritromicina, 3 mg L^{-1} de nitrofurantoina, 300 mg L^{-1} de rifampicina e $300 \mu\text{g L}^{-1}$ de ancomicina foram plaqueados de forma equidistante. A avaliação foi realizada após 48 h, através da medição do halo de inibição. Na placa

testemunha foi adicionada ao meio de cultura, discos de papel filtro umedecidos apenas com água destilada e esterilizados.

Resultados e Discussão

Cultivo em casa de vegetação - As UPs de helicônia bacterizadas com RPCP, cultivadas em casa de vegetação, apresentaram diferentes respostas em relação às variáveis analisadas, mostrando influência positiva e negativa dos diversos isolados no crescimento e desenvolvimento das plantas. Esse é um fato comum no ambiente da rizosfera de qualquer planta, onde, em geral, ocorre um equilíbrio entre microrganismos benéficos e deletérios (Whipps 2000). Uma pequena mudança neste balanço pode desencadear uma doença ou, por outro lado, resultar no controle biológico de patógeno ou promoção do crescimento da planta. A maioria dos trabalhos com RPCP discutem apenas o efeito benéfico dessas bactérias, não comentando sua ação deletéria. Embora não diferindo estatisticamente da testemunha, o isolado ENF1 exerceu um efeito positivo sobre a área foliar e a produção de biomassa da parte aérea, traduzida esta última, pelo aumento de peso da matéria seca (tabela 2).

O fato de um isolado de feijão (ENF1) ter promovido crescimento em plantas de helicônia sugere a não especificidade, como relatada por Quadthallmann & Kloepper (1996), onde descrevem que

isolados originais de um hospedeiro podem facilmente colonizar outros hospedeiros de espécies diferentes, até mesmo com maior intensidade. Assim, os mesmos autores relatam que quando a bactéria endofítica *Enterobacter asburiae*, isolado JM22 de algodão foi inoculada em feijão e pepino, foram detectadas maiores populações do que em seu hospedeiro original. Da mesma forma Shishido & Chanway (1998) observaram que a promoção do crescimento de plântulas de abeto, resultante da aplicação de bactérias oriundas do mesmo ecossistema foi baixo, não sendo, portanto, necessário combinar outros isolados, como *Pseudomonas*, com ecótipos de abeto e tipos de solo, para uma efetiva promoção de crescimento de plântulas, confirmando dessa forma, a não especificidade, como encontrado neste trabalho. No entanto, alguns autores enfatizam a necessidade da utilização de isolados residentes ou adaptados ao hospedeiro, justificando a maior capacidade de colonização, menor risco na introdução de organismos exógenos (Khalid *et al.* 2004) e especificidade entre o isolado de RPCP e o hospedeiro (Enebak *et al.* 1998).

Nas plantas tratadas com o isolado C22 observou-se, em relação às testemunhas, aumento no peso da matéria seca da parte aérea (IAPSPA), na área foliar (IAAF) e no número de folhas (IANF), respectivamente, 4,79%, 2,43% e 14,8% (tabela 2). Os demais tratamentos não apresentaram aumento nos IANF, IAAF e IAPSPA. Lakawatana & Criley (1989) observaram incremento na emissão de brotos

Tabela 2. Influência de bactérias promotoras de crescimento (RPCP) no desenvolvimento de plantas de *Heliconia psittacorum* durante três meses em casa de vegetação.

PGPR	NF ¹	IANF %	AF (cm ²)	IAAF %	PSPA (g)	IAPSPA %	PSSR+RIZ (g)
ENF1 ²	5,40 ab ³	0	333,00 a	7,78	1,80 a	7,78	2,20 a
C22	6,50 a	14,8	298,75 a	2,43	1,75 a	4,79	2,25 a
C25	5,66 ab	0	236,33 abc	0	1,67 ab	0	1,83 a
ENF6	4,80 b	0	282,80 a	0	1,60 a	0	2,20 a
ENF5	5,33 ab	0	278,17 ab	0	1,50 ab	0	1,67 a
R14	4,75 b	0	271,00 ab	0	1,50 ab	0	2,25 a
C240	4,50 b	0	216,00 abc	0	1,00 ab	0	2,00 a
C210	5,50 ab	0	146,00 bc	0	1,00 ab	0	1,50 a
IF82	4,33 b	0	128,33 c	0	0,66 b	0	1,33 a
TEST.	5,66 ab	0	291,67 a	0	1,67 a	0	2,33 a
C.V.(%)	26,85		42,28	59,29			60,68

¹NF = número de folhas; IANF = índice de aumento do número de folhas; AF = área foliar; IAAF = índice de aumento da área foliar; PSPA = peso seco da parte aérea; IAPSPA = índice do peso seco da parte aérea; PSSR+RIZ = peso seco do sistema radicular e rizoma. ²ENF5, ENF1 e ENF6 (não identificadas). C22 e C25 (*Bacillus* sp.), R14 e IF82, (*B. subtilis*), C210 e C240 (*B. cereus*). ³Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ao nível de 5% pelo teste da D.M.S.

vegetativos do pseudocaulo e atribuíram esse efeito ao aumento do número de folhas em *H. stricta* “Dwarf Jamaican” produzidas em vasos, e consideraram que esse fato foi decorrente do maior desenvolvimento do sistema assimilador. A área foliar é um parâmetro de medida de crescimento expressivo, pois as folhas são as principais responsáveis pela captação da energia solar e conseqüentemente, pela produção de matéria orgânica através da fotossíntese. O fato de os tratamentos não apresentarem aumentos significativos de biomassa, pode ser atribuído a diversos fatores, entre os quais a utilização de pequeno número de isolados. Outro fator que poderia ter resultado em benefício do desenvolvimento seria a utilização de isolados endofíticos e epifíticos provenientes de helicônia. Apesar de certos autores não considerarem a especificidade bactéria-hospedeiro como essencial para a promoção de crescimento (Quadt-Hallmann & Kloepper 1996, Shishido & Chanway 1998), outros pesquisadores enfatizam a importância dessa especificidade para a obtenção de bons resultados (Enebak *et al.* 1998, Srinath *et al.* 2003). Por outro lado, a capacidade e o tipo de colonização dessas bactérias no rizoma e raízes de helicônia, pode ser questionada, uma vez que não foram feitos ensaios para quantificar a população bacteriana na superfície e no interior dos órgãos bacterizados. Sabe-se, no entanto, que o isolado C22 pertence ao gênero *Bacillus* e foi originalmente obtido da superfície de folhas de couve. O gênero *Bacillus* é residente comum do filoplano de várias plantas cultivadas onde persiste e se redistribui, além de ser isolado da rizosfera de várias espécies vegetais (Probanza 1996). Além disso, Hallmann *et al.* (1997) incluem este gênero entre os endofíticos comuns em várias espécies vegetais. Embora não tendo sido determinado o tipo de colonização realizada pelo isolado C22, ele pode ter colonizado tanto interna como externamente as unidades propagativas tratadas, uma vez que essas bactérias apresentam tanto à capacidade de colonizar os tecidos externos quanto internos da planta, podendo sintetizar reguladores de crescimento ou induzir a síntese desses compostos (Barazani & Friedman 1999). As espécies *Bacillus licheniformis* (Weigmann) Chester e *B. pumilus* Meyer & Gottheil isolados da rizosfera de amieiros (*Alnus glutinosa* L.) promoveram aumentos de altura (182%), superfície aérea (163%), número de folhas e nitrogênio total, provavelmente devido à produção de compostos como auxinas (AIA-1), detectados por cromatografia

gasosa de alta resolução (HRGC) em níveis de 1,736 a 1,790 mg L⁻¹ e meio de cultura (Probanza 1996). Desde que não foi analisada a produção de substâncias como bioreguladores pelas bactérias testadas, a ausência ou baixa produção desses reguladores pode ainda ser sugerida como causa do baixo efeito dos tratamentos. Dentre as bactérias capazes de sintetizar substâncias do tipo reguladores de crescimento vegetal estão os gêneros *Bacillus* (Gutierrez-Mañero 1996), *Pseudomonas putida* (Barazani & Friedman 1999), *Azospirillum*, *Xanthomonas*, *Rhizobium*, *Alcaligenes faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Acetobacter diazotrophicus* e *Bradyrhizobium japonicum* (Khalid *et al.* 2004). Esses autores sugerem que até 80% das bactérias isoladas da rizosfera são capazes de produzir AIA.

No presente trabalho, houve correlação positiva entre o peso da matéria seca da parte aérea com o peso da matéria seca do sistema radicular ($r = 0,70$), com o número de folhas ($r = 0,72$) e principalmente, com a área foliar ($r = 0,83$) (figura 1).

Os isolados C210 e IF82 induziram redução significativa na área foliar e no peso da matéria seca da parte aérea (IF82), em comparação com o tratamento controle. Os demais tratamentos não reduziram a área foliar, embora não tenham promovido o crescimento das plantas, de acordo com as variáveis avaliadas (tabela 2). A ocorrência de efeitos positivos ou deletérios já foi constatada por diversos autores (Probanza 1996, Khalid *et al.* 2004) e parece estar correlacionada com a espécie de microrganismo testada. Probanza (1996) observou a redução de comprimento da parte aérea e raízes, bem como da biomassa de plântulas de pinus (*Pinus taeda* L.) tratadas com os isolados *B. subtilis* (BS1 e BS2), enquanto que outros isolados aumentaram significativamente a biomassa do sistema radicular da mesma espécie. O mesmo autor detectou o efeito prejudicial de sete isolados de *Pseudomonas fluorescens* (Trevisan) Migula, obtidos de rizosfera de amieiro, sobre o crescimento desse hospedeiro. Além da redução do crescimento, algumas bactérias são capazes de aumentar o nível de doenças conforme relatado por Noronha *et al.* (1995), com *Bacillus* spp. em relação ao “damping-off” do caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) causado por *Rhizoctonia solani* Kühn.

Cultivo *in vitro* de ápices caulinares - A contaminação de plântulas não é rara, mesmo durante a fase de multiplicação *in vitro*. A bacterização das UPs de

helicônia, de onde foram retirados os ápices caulinares, não mostrou ser uma metodologia eficaz no controle de contaminações bacterianas durante o cultivo *in vitro*. Também não se verificou efeito promotor de crescimento do tecido vegetal. No entanto, há registros de que a utilização de RPCP durante a micropropagação de plantas de batata (*Solanum tuberosum* L.) (Novak 1998) e *Ficus benjamina* (Srinath *et al.* 2003) que, além de promover o crescimento dos explantes *in vitro*, exerce o biocontrole de fitopatógenos e induz uma melhor adaptação ao transplantio.

Ao contrário do esperado, as RPCP no cultivo *in vitro* de ápices caulinares de helicônias cresceram abundantemente no meio de cultivo, superando o desenvolvimento dos explantes, provavelmente devido à competição por nutrientes. A ocorrência de bactérias durante a micropropagação de helicônia já foi registrada na literatura (Nannetti 1994, Atehortua *et al.* 1999), constituindo-se problema importante para o

cultivo *in vitro* dessa espécie ornamental. Dentre as bactérias registradas, apenas *B. subtilis* foi identificada (Nannetti 1994). É possível que a ocorrência de contaminação bacteriana no processo de micropropagação de helicônia seja de natureza endofítica, pois, em geral, as condições de cultivo *in vitro* de tecidos vegetais favorecem o crescimento de bactérias que normalmente habitam tecidos internos sem causarem sintomas de doenças. Essas bactérias podem se multiplicar lentamente e não serem detectadas até atingirem uma densidade maior, ou permanecerem viáveis sem se multiplicarem devido à limitação de nutrientes. Dessa forma, elas são subcultivadas e transferidas para a progênie das plantas micropropagadas, agindo como fonte de contaminação macroscópica se alterações ambientais ou fisiológicas as favorecerem (Srinath *et al.* 2003). Khalid *et al.* (2004) relatam que na inoculação de explantes contaminados, principalmente com bactérias, pode haver competição pelos nutrientes do meio de cultura

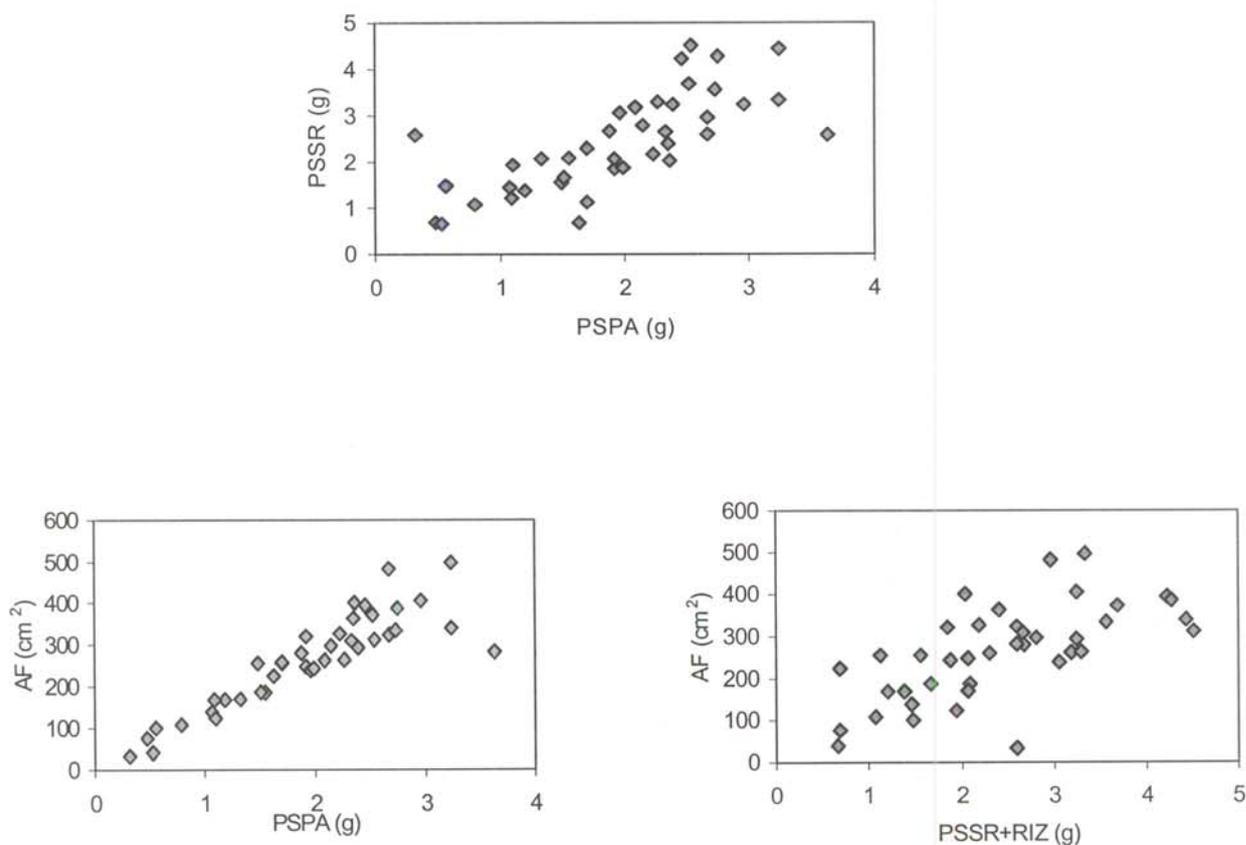


Figura 1. Correlação entre peso da matéria seca da parte aérea (PSPA) e peso da matéria seca da raiz (PSSR) ($r = 0,70$), peso da matéria seca do sistema radicular e rizoma (PSSR + RIZ) ($r = 0,72$) e área foliar (AF) ($r = 0,83$), de plantas de *H. psittacorum* aos 90 dias de cultivo em casa de vegetação.

e que em alguns casos a inoculação de plantas com rizobactérias tem efeito negativo no crescimento. A maioria das bactérias que colonizam tecidos de plantas é facilmente cultivável em meios de cultura simples. Esses microrganismos devem ser eliminados pelo uso de antibióticos os quais nem sempre proporcionam níveis adequados de controle e podem ser tóxicos ao desenvolvimento do explante (Gunson & Spencer-Phillips 1994).

Antibiograma - O antibiograma realizado em isolados bacterianos, provenientes de explantes contaminados, revelou uma maior sensibilidade das bactérias contaminantes ao antibiótico rifampicina. As doses de 0,5 e 1,0 g L⁻¹ aplicadas no meio de cultivo inibiram o crescimento bacteriano, porém os explantes inoculados não se desenvolveram e possivelmente morreram por fitotoxidez. Já no meio com 0,1 g L⁻¹ do antibiótico, a contaminação bacteriana persistiu e inibiu o desenvolvimento dos explantes. O tratamento com 0,2 g L⁻¹ permitiu a regeneração de apenas uma planta sem contaminação bacteriana. O antibiótico foi retirado do meio de cultura aos 30 dias de cultivo, e após o segundo subcultivo (60 dias) ocorreu crescimento bacteriano, resultando na morte da planta. Nas demais repetições desse tratamento (0,2 g L⁻¹) o crescimento bacteriano ocorreu já nos primeiros 30 dias de cultivo.

A ausência de controle bacteriano por antibióticos pode ser atribuída à rápida degradação do princípio ativo, seleção de isolados mutantes resistentes e, ainda, à grande quantidade de bactérias no tecido, internamente ou na superfície (Gunson & Spencer-Phillips 1994). Concentrações mínimas de bactericidas devem ser determinadas para cada isolado contaminante, levando-se em consideração também o grau de fitotoxidez do princípio ativo (Capó 1998). Gilbert *et al.* (1991) observaram que misturas de antibióticos (ABM1 = penicilina, estreptomicina, anfotericina e NaCl e ABM2 = eritromicina, estreptomicina e carbenicilina), adicionadas ao meio de micropropagação, reduziram o crescimento da planta, induziram altos níveis de clorose e não eliminaram a contaminação.

Em síntese, os isolados de bactérias testados não promoveram controle de contaminações no cultivo *in vitro*. Por outro lado, no que se refere ao controle químico, o antibiótico rifampicina foi fitotóxico nas concentrações de 0,5 e 1,0 g L⁻¹ enquanto a 0,2 g L⁻¹ controlou, apenas inicialmente, a contaminação bacteriana.

Literatura citada

- Atehortua, L., Urrea, A.L., Gel, U., Mora, B., Valencia, C. & Corrales, M.** 1999. Heliconia Tissue Culture. Bulletin Heliconia Society International 9: 16-17.
- Amorim, E.P.R. & Melo, I.S.** 2002. Ação antagonista de rizobactérias contra *Phytophthora parasitica* e *P. citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. Revista Brasileira de Fruticultura 24: 565-568.
- Barazani, O. & Friedman, J.** 1999. Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria? Journal of Chemical Ecology 25: 2397-2406.
- Capó, Y.A.** 1998. Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas. In: J.N.P. Ponce (ed.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Villa Clara, pp. 80-102.
- Castro, C.E.F.** 1993. Helicônias como flores de corte: adequação de espécies e tecnologia pós-colheita. Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 183 p.
- Dey, R., Pal, K.K., Bhatt, D.M. & Chauhan, S.M.** 2004. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. Microbiological Research 159: 371-394.
- Edgington, L.V., Khew, K.L. & Barron, G.L.** 1971. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. Phytopathology 61: 42-47.
- Enebak, S.A., Wei, G. & Klopfer, J. W.** 1998. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on loblolly and slash pine seedlings. Forest Science 44: 141-143.
- Gilbert, J.E., Shohet, S. & Caligari, P.D.S.** 1991. The use of antibiotics to eliminate latent bacterial-contamination in potato tissue-culture. Annals of Applied Biology 119: 113-120.
- González, E.A.J.** 1998. Cultivo de ápices caulinares. In: J.N.P. Ponce (ed.). Propagación y Mejora Genética de plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Villa Clara, pp. 45-56.
- Gunson, H.E. & Spencer-Phillips, P.T.N.** 1994. Latent bacterial infections: epiphytes and endophytes as contaminants of micropropagated plants. In: P.J. Lumsden, J.R. Nicholas & W.J. Davies (eds.). Physiology, Growth and Development of Plants in Culture. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 379-396.
- Gutierrez-Mañero, F.J.** 1996. The influence of native rhizobacteria on european alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn) growth. Plant and Soil 182: 67-74.
- Hallmann, J.W., Kloepper, J.W. & Rodriguez-Kábana, R.** 1997. Application of scholander pressure bomb to studies on endophytic bacteria of plants. Canadian Journal of Microbiology 43: 411-416.

- Hoagland, D.R. & Arnon, D.J.** 1950. The water-culture method for growing plants without soil. Agriculture Experimental Station, Davies, pp. 1-39, (Circular 346).
- Khalid, A., Arshad, M. & Zahir, Z.A.** 2004. Screening plant growth-promoting rhizobacteria improving growth and yield of wheat. *Journal of Applied Microbiology* 96: 473-480.
- Lakawatana, S. & Criley, R.A.** 1989. Pot culture of *Heliconia stricta* "Dwarf Jamaican". *Acta Horticulturae* 252: 123-128.
- Murashige, T. & Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Nannetti, D.C.** 1994. Utilização da cultura de tecidos vegetais na micropropagação e manutenção de *Heliconia* sp. Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 125 p.
- Noronha, M.A., Michereff, S.J. & Mariano, R.L.R.** 1995. Efeito do tratamento de sementes de caupi com *Bacillus subtilis* no controle de *Rhizoctonia solani*. *Fitopatologia Brasileira* 20: 174-178.
- Novak, J.** 1998. From laboratory to applications: challenges and progress with *in vitro* dual culture of potato and beneficial bacteria. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 52: 97-103.
- Probanza, A.** 1996. The influence of native rhizobacteria on european alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) growth. *Plant and Soil* 182: 59-66.
- Pusey, P.L. & Wilson, C.L.** 1984. Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. *Plant Disease* 68: 753-756.
- Quadt-Hallmann, A. & Klopper, J.W.** 1996. Immunological detection and localization of the cotton endophyte *Enterobacter asburiae* JM22 in different plant species. *Canadian Journal of Microbiology* 42: 1144-1154.
- Sewake, K.T. & Uchida, J.Y.** 1995. Diseases of heliconia in Hawaii. College of Tropical Agriculture and Human Resources, Hawaii, 18 p.
- Shishido, M. & Chanway, C.P.** 1998. Spruce growth response specificity after treatment with plant growth-promoting Pseudomonads. *Canadian Journal of Botany* 77: 22-31.
- Srinath, J., Bagyaraj, D.J. & Satyanarayana, B.N.** 2003. Enhanced growth and nutrition of micropropagated *Ficus benjamina* to *Glomus mosseae* co-inoculated with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus coagulans*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 19: 69-72.
- Whipps, J.M.** 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 52: 487-511.
- Zonta, E.P. & Machado, A.A.** 1987. SANEST - Sistema de análise estatística para microcomputadores. Pelotas: DMEC/IFM/UFPel, 138 p.