

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA  
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA  
LABORATÓRIO DE BACTERIOLOGIA DE PLANTAS  
36.571-000 VIÇOSA - MG - BRASIL

DETECÇÃO DE *Agrobacterium tumefaciens* PELO USO DE  
FOLHAS DE *Kalanchoe tubiflora* COMO ISCAS BIOLÓGICAS

Reginaldo da Silva Romeiro  
Professor Titular da UFV

## INFORMAÇÃO BÁSICA

A maioria dos tumores de plantas com etiologia bacteriana são incitados por *Agrobacterium tumefaciens* (Romeiro, 1995; Scortichini, 1995). O isolamento do patógeno ou sua detecção em solo e em outros substratos costuma ser bastante difícil pois esses tumores, em condições naturais, ocorrem ou no colo da planta ou no sistema radicular e a população de saprófitas associada aos tecidos do tumor é grande (Fahy & Persley, 1983; Lelliott & Stead, 1987).

Isolar o patógeno ou detectar sua presença em solo ou material vegetal pode ser conseguido pelo uso de folhas de *K. tubiflora* como iscas biológicas.

(Beriam *et al.*, 1995) desenvolveram uma técnica fácil, simples, rápida e altamente eficiente para detectar *A. tumefaciens* que consiste no uso de folhas de *Kalanchoe tubiflora* como iscas biológicas.

*K. tubiflora* é uma planta da família Crassulaceae, comum no sudeste brasileiro (Figura 1), eventualmente usada como ornamental, que possui a peculiaridade de se propagar vegetativamente com grande facilidade, por enraizamento de folhas destacadas. A eficiência da técnica fundamenta-se na grande sensibilidade da planta-teste a *A. tumefaciens* aliada à rapidez com que os sintomas surgem em folhas inoculadas após o contato da bactéria com os tecidos da planta (Figura 2).

### FASE I : PREPARO E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Amostras de solo e, ou, plantas infectadas, recentemente coletadas na micro-região de Barbacena-MG, em roseirais onde a galha da roseira (*A. tumefaciens*) ocorre de forma endêmica serão usadas em tentativas de detecção e, ou, isolamento.

- a) Solo: Preparar suspensão de solo (10 g/ 100ml de salina) e deixar sob agitação contínua por uma noite. Deixar decantar, centrifugar o sobrenadante a 2.000 rpm/10 minutos. Descartar o precipitado e filtrar o sobrenadante em papel de filtro comum.
- b) Tumor: Fracionar em pequenos fragmentos ((10 g de tecido/ 100ml de salina) e triturar em salina estéril, (manualmente, com almofariz e gral) ou com triturador tipo Ultraturrax. Filtrar grosseiramente e salvar o filtrado.
- c) Lavado de rizoplano: Remover mecanicamente o solo aderido ao sistema radicular, da melhor forma possível. Fracionar as raízes em pequenos fragmentos e deixar sob contínua agitação (10g de raízes / 100 ml de salina) por uma noite. Filtrar e salvar o filtrado.

## FASE II :BIOENSAIO COM FOLHAS DE *K. tubiflora*

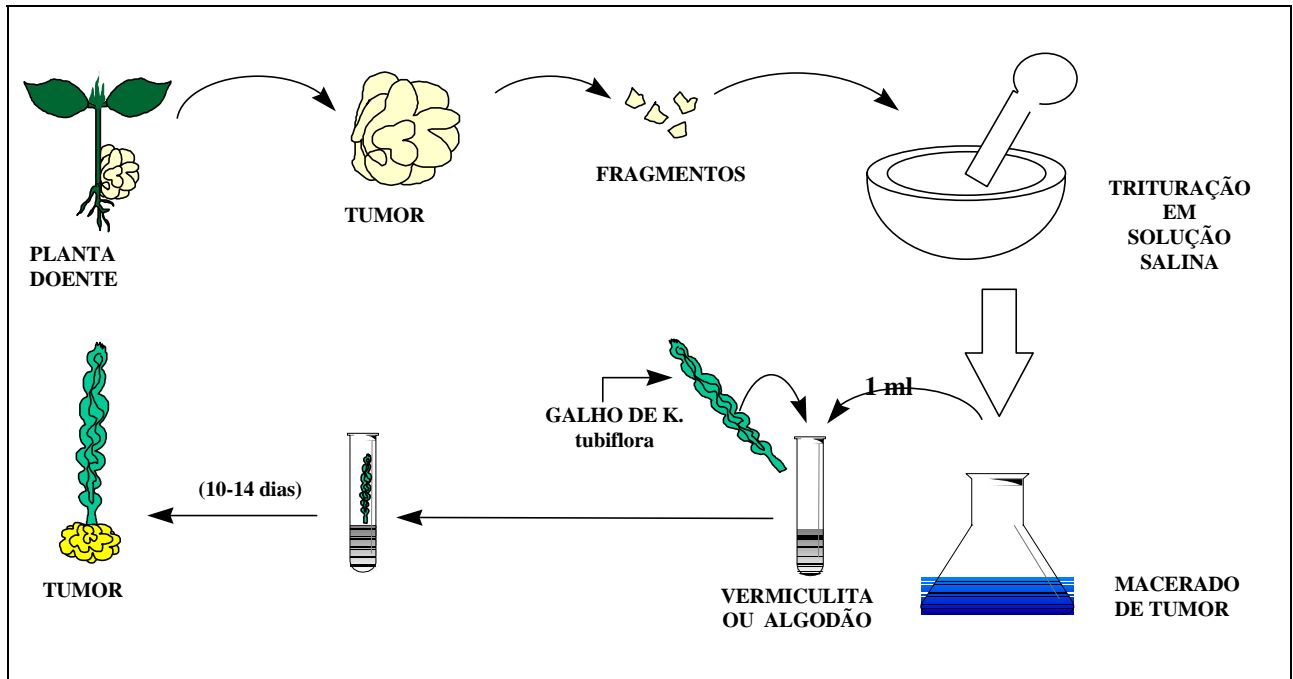


Figura 1: Exquema explicativo da metodologia empregada por BERIAM et alii (1995) para o isolamento indireto de *A. tumefaciens* utilizando folhas destacadas de *K. tubiflora* como iscas biológicas

- Trabalhar com folhas de *K. tubiflora* que tenham atingido completa maturidade fisiológica pois folhas muito jovens podem sofrer apodrecimento antes de surgirem os sintomas ou mostrarem-se menos suscetíveis (Napoleão & Romeiro, 1996; Napoleão *et al.*, 1998; Napoleão *et al.*, 1995; Silva & Romeiro, 1998a; Silva & Romeiro, 1998b; Silva *et al.*, 1996).
- Autoclavar tubos de cultura contendo, no fundo, uma camada de vermiculita estéril com 1 a 1,5cm de altura. Os tubos não carecem de ser vedados.
- Adicionar á camada de vermiculita dos tubos a preparação obtida pela ressuspensão do precipitados (5ml).
- Tomar folhas totalmente desenvolvidas e recém-destacadas da planta teste, e transferí-las, uma por tubo, com o ápice voltado para cima e o ponto de inserção no caule em direto contato com a camada de vermiculita.
- Deixar os tubos na posição vertical, destapados, em ambiente de laboratório. Em caso de se observar secamento da camada de vermiculita, adicionar algumas gotas de água
- Caso estejam presentes, no extrato usado para umidecer a vermiculita, células viáveis do patógeo em quantidade suficiente, surgem na base das folhas, conspícuos tumores, totalmente diferentes, em aspecto visual, de calos fisiológicos de enraizamento. Naturalmente que tubos-controle devem ser preparados, contendo vermiculita embebida apenas em água estéril.
- Tumores surgidos devem ser usados para isolamento, na próxima fase. Em caso de sucesso no isolamento, tumores são nitidamente visualizados dentro de 2-3 semanas

## BIBLIOGRAFIA

- Beriam, L. O. S., Malavolta Jr, V. A. & Romeiro, R. S. Metodologia simples para isolamento indireto de *Agrobacterium tumefaciens*. Fitopatologia Brasileira, 20: 282, 1995 [Abstract]
- Fahy, P. C. & Persley, G. J. *Plant Bacterial Diseases - A Diagnostic Guide*, 1. 1 vols, Academic Press, Sidney. 1983, 393 p
- Lelliott, R. A. & Stead, D. E. *Methods for the Diagnosis of Bacterial Plant Disease*, Blakwell Scientific Publications, Oxford. 1987, 216 p
- Napoleão, R. L. & Romeiro, R. S. Controle biológico de *Agrobacterium tumefaciens*. Fitopatologia Brasileira, 21: 343, 1996 [Abstract]
- Napoleão, R. L., Romeiro, R. S., Beriam, L. O. S. & Barbosa, J. G. A bioassay for rapid screening of bacteria antagonistic to *Agrobacterium tumefaciens*. Fitopatologia Brasileira, 23: 27-29, 1998 Artigo
- Napoleão, R. L., Romeiro, R. S., Oliveira, J. R. & Erthal Jr, M. Método rápido e eficiente "in vivo" para testagem de potenciais procariotas antagonistas a *Agrobacterium tumefaciens*. Fitopatologia Brasileira, 20: 376, 1995 [Abstract]
- Romeiro, R. S. *Bactérias Fitopatogênicas*, Editora UFV, Viçosa. 1995, 367 p
- Scortichini, M. *Malattie atteriche delle colture agrarie*, Edagricole, Bologna. 1995, 636 p
- Silva, H. S. A. & Romeiro, R. S. Biocaracterização de actinomicetos selecionados para o controle biológico de *Agrobacterium tumefaciens*. Fitopatologia Brasileira, 23: 216, 1998a [Abstract]
- Silva, H. S. A. & Romeiro, R. S. Ocorrência da galha bacteriana da roseira (*Agrobacterium tumefaciens*) no município de Cascavel, Estado do Paraná, Brasil. Fitopatologia Brasileira, 23: 216, 1998b [Abstract]
- Silva, H. S. A., Romeiro, R. S., Beriam, L. O. S., Ribeiro, R. P., Bar-bosa, J. G., Moura, A. B., Oliveira, J. R. & Napoleão, R. L. Um modelo biológico para triagem massal de actinomicetos como potenciais antagonistas a *A. tumefaciens*. Fitopatologia Brasileira, 21: 340, 1996 [Abstract]