



### Ocorrência de Endófitos do Gênero *Bacillus* em Seiva de Plantas de Milho

Ivanildo Evódio Marriel<sup>1</sup>, Fernando Valicente<sup>1</sup>,  
Cíntia Guimarães dos Santos<sup>2</sup>, Edilson Paiva<sup>1</sup>,  
Lucy Seldin<sup>2</sup>

Existem evidências de que muitas plantas são naturalmente colonizadas por microrganismos endofíticos. Neste texto, endófitos referem-se àqueles microrganismos que colonizam os tecidos internos das plantas de modo obrigatório ou facultativo. Os efeitos desses microrganismos sobre a planta variam de prejudiciais a benéficos. Atualmente, esses microrganismos têm recebido atenção especial, pelas seguintes razões: as técnicas de biologia molecular têm permitido isolar genes potencialmente de interesse, que poderiam ser incorporados em plantas; os genomas microbianos são mais adequados como ferramentas de biologia molecular que os de plantas; as monocotiledôneas apresentam, ainda, maiores entraves para serem transformadas e regeneradas por outros métodos. Baseado nesses princípios, um endófito poderia ser isolado, alterado para conter um gene de interesse e reintroduzido

facilmente no xilema da planta hospedeira. Em razão da associação interna com a planta, esses microrganismos apresentam vantagem competitiva em relação aos de vida livre. O relacionamento íntimo com o hospedeiro daria aos microrganismos endofíticos do xilema uma melhor chance de sobrevivência e de estabelecimento.

Um dos problemas centrais com a identificação de bactérias endofíticas é a eliminação de bactérias de superfície durante as etapas de isolamento. A esterilização por diferentes métodos químicos tem sido feita como estratégia para recuperar bactérias endofíticas que persistem inter e intracelularmente em tecidos de plantas. Entretanto, torna-se claro que a eficiência dessas técnicas está sujeita a uma ampla variação, devido a diferentes condições de crescimento, da idade da planta, e estrutura das raízes, que demandam a determinação experimental prévia de métodos

<sup>1</sup>Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo. Caixa Postal 151, CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG.

E-mail: imarriel@cnpmis.embrapa.br. <sup>2</sup>Mestranda da Universidade Federal de Lavras - UFLA.

<sup>3</sup>Professora do Dep. de Genética da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

de esterilização eficientes. Propôs-se a utilização da seiva coletada de maneira adequada, em termos de assepsia, como alternativa para superar essas dificuldades enumeradas.

Entre as bactérias abundantes no ambiente e importantes do ponto de vista biotecnológico, os bacilos têm despertado interesse, particularmente a espécie *B. thuringiensis*. As bactérias pertencentes a essa espécie têm sido utilizadas como biopesticida, uma alternativa importante do ponto de vista ambiental, do manejo integrado de pragas e de uma agricultura sustentável. Elas sintetizam uma delta-toxina, muitas das quais são tóxicas e específicas para certas espécies de insetos das ordens Lepidoptera, Diptera ou Coleoptera, não afetando outros organismos e o meio ambiente.

Procurou-se, neste trabalho, desenvolver um método para o isolamento rápido de bactérias endofíticas do gênero *Bacillus*. A metodologia utilizada foi definida a partir de testes preliminares envolvendo testes de limpeza prévia das plantas e de coleta das seivas, de diferentes fontes de carbono para o enriquecimento e de temperatura para o crescimento das culturas bacterianas.

Para avaliar a viabilidade do método, efetuaram-se isolamentos de bactérias a partir de seiva de diferentes genótipos de milho cultivados em dois tipos de solos, de cerrado e de várzea, na presença da microbiota natural. Foram analisadas amostras de seiva de 29 genótipos de milho. Três plantas de cada genótipo, no estágio de florescimento, foram colhidas no campo e transportadas para o laboratório, onde os colmos tiveram as palhas removidas. Os colmos foram limpos, desinfestados superficialmente com álcool etílico 80% e cortados em seções correspondentes aos entrenós. As amostras de seiva, constituídas das subamostras das três plantas, foram coletadas de cada entrenó sob pressão positiva, em tubos de ensaio esterilizados. Uma alíquota de 1 ml de cada amostra de seiva foi filtrada e transferida para microtubos e armazenada em geladeira, até o momento das análises.

O enriquecimento da cultura para isolamento foi efetuado com a transferência de duas gotas de seiva, sem aditivos, para frascos tipo penicilina, com capacidade para 10 ml, contendo 5 ml de meio semi-sólido com a seguinte composição: 10 g de gelatina,  $K_2PO_4$  (0,5 g);  $MgSO_4$  (0,2); NaCl (0,1);  $CaCl_2$  (0,02); 2 ml de solução FeEDTA 1,64 %, 1 ml de solução de vitaminas (biotina, 10 mg; piridoxol - HCl, 20 mg) e 1 mL de uma solução de micronutrientes constituída de :  $CuSO_4$  (0,4);  $ZnSO_4$  (0,12 g);  $H_2BO_3$  (1,4 g);  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  (1,0);  $MnSO_4 \cdot H_2O$  (1,5 g). O pH foi ajustado para 6,5 e 1,75 g de agar foi adicionado, sem azul de bromotimol. Após 24 a 48 horas de crescimento à temperatura de 32 graus centígrados, as culturas enriquecidas foram agitadas e diluídas a  $10^{-1}$ . Essa suspensão de células foi aquecida à temperatura de 80 graus durante 10 minutos. Efetuou-se, então, uma diluição seriada  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$  e uma alíquota de cada diluição foi distribuída em placa de petri contendo meio caldo de soja trip-caseína (20 g /L), e agar ( 15 g/L). Após três a quatro dias, as colônias isoladas foram purificadas através da repicagem para outra placa contendo o mesmo meio. As colônias puras foram transferidas e armazenadas em meio sólido inclinado, caldo de soja trip-caseína, sob óleo mineral esterilizado.

A caracterização e a identificação das bactérias isoladas foram efetuadas com base nos critérios descritos por Seely et al. (1991). O gênero *Bacillus* é composto de diferentes espécies e subespécies. Essa bactéria é bioquimicamente classificada como gram positiva, de forma bacilar, produtora de endosporos, aeróbica ou anaeróbica facultativa. A espécie *B. thuringiensis* produz cristais protéicos que permitem a sua distinção de outras espécies. Esses corpos de inclusão são visíveis ao microscópio de contraste de fase.

A comparação dos dados preliminares obtidos sobre a eficiência do método mostrou que a concentração de gelatina utilizada permitiu rápido crescimento das bactérias, observado pela formação de uma película espessa e difusa, no meio semi-sólido, após 24 horas de

incubação. As tentativas de se utilizar a seiva coletada diretamente, sem o enriquecimento prévio, permitiu pouco sucesso no isolamento, com baixo número de colônias desenvolvidas nos meios testados. Não obstante as prováveis diferenças entre compostos produzidos pelos genótipos, além das diferentes condições de ambiente de solo, que poderiam influenciar o enriquecimento das bactérias no meio de cultura, as análises mostraram uma elevada incidência de bactérias nas amostras de seiva de todos os genótipos de milho analisados (Tabela 1). Após o isolamento e a purificação, as bactérias foram analisadas quanto às características morfológicas e bioquímicas. Após cinco dias de crescimento em meio sólido, observou-se uma ampla variação na morfologia das colônias, variando em tamanhos de 0,5 a 6 mm, de cor creme-clara a escura, de forma oval a arredondada, de borda irregular a regular, de superfície lisa a enrugada e de aspecto seco a úmido. Dos isolados obtidos, a maioria deles,

acima de 80 %, foi constituída de bactérias classificadas como gram-positivos e que apresentavam características morfológicas de células, sob microscopia de contraste de fase, idênticas às do gênero *Bacillus*, com base na presença de endosporos. Dos isolados obtidos, quatro foram identificados como pertencentes à espécie *B. thuringiensis*, em razão da presença dos cristais protéicos característicos dessa bactéria. Vale salientar que, embora a literatura mencione que bactérias do gênero *Bacillus* possam ser isoladas de solo e de plantas, os levantamentos efetuados nas bases de dados disponíveis não revelaram nenhuma citação da ocorrência dessa bactéria como endófito natural de plantas de milho.

Os resultados demonstraram que a metodologia mostrou-se eficiente para detectar rapidamente a ocorrência de endófitos do gênero *Bacillus* no xilema das plantas analisadas, na ausência de inoculação artificial.

**Tabela 1.** Caracterização morfológica e identificação de bactérias isoladas de seiva de milho cultivado em dois tipos de solo, na presença da microbiota natural. Embrapa Milho e Sorgo. Sete Lagoas, MG, 1998.

Isolados	Genótipos	Solo	Características morfológicas de colônias	Identificação
BSM 011097	BR 201 F	Cerrado	Tamanho aproximado de 6 mm, cor creme, com o centro creme mais escuro e enrugado, forma arredondada, borda regular e superfície lisa.	<i>Bacillus</i> spp
BSM 021097	BR 201 F	Cerrado	Tamanho variando entre 8 mm e 2,7 cm, forma arredondada com bordas indefinidas, aspecto de algodão.	<i>Bacillus</i> spp.
BSM 031097	BR 201 M	Cerrado	Tamanho aproximado de 0,7 mm, cor creme com o centro creme mais escuro e enrugado, formato arredondado, borda irregular, superfície lisa.	<i>Bacillus</i> spp.
BSM 041097	L 723	Cerrado	Tamanho aproximado de 2 mm, cor creme-clara, forma arredondada com o centro enrugado, borda regular, superfície lisa em relevo.	<i>Bacillus</i> spp.
BSM 051097	HS 201	Cerrado	Tamanho aproximado de 6 mm, cor creme, com o centro amarelo, formato arredondado, aspecto gomo de laranja, superfície lisa, borda definida, colônia úmida.	<i>Bacillus</i> spp.
BSM 061097	RS 44500	Várzea	Tipo mucóide, cor amarelo forte, forma arredondada, centro amarelo e enrugado, borda regular e superfície lisa.	<i>Bacillus</i> spp.
BSM 071097	RS 44500	Várzea	Tamanho aproximado de 1 a 4 mm, cor creme, forma arredondada, centro amarelo e enrugado, borda regular e superfície lisa.	ND
BSM 081097	SP 42079	Várzea	Tamanho aproximado de 7 mm, cor creme, forma oval, superfície rugosa, borda irregular, o centro não definido.	<i>Bacillus</i> spp.
BSM 091097	SP 42079	Várzea	Tamanho aproximado de 2 a 4 mm, cor creme e transparente, o centro amarelo (mais escuro do que a borda), forma arredondada com borda irregular e superfície lisa.	<i>Bacillus</i> spp.
BSM 101097	PC 97	Várzea	Tamanho aproximado de 2 mm, cor creme com o centro mais amarelado e rugoso, forma oval a arredondada, borda definida, superfície lisa.	ND
BSM 111097	PC 97	Várzea	Tamanho aproximado de 6 mm, cor creme, forma arredondada com borda irregular, superfície farinácea.	<i>Bacillus</i> spp.
BSM 121097	BR 205	Várzea	Tamanho aproximado de 3 mm, cor creme, forma arredondada, centro amarelo e enrugado, borda regular, superfície lisa.	<i>Bacillus</i> spp.
BSM 131097	PR 41648	Várzea	Tamanho aproximado de 4 mm, cor creme com o centro mais escuro, forma arredondada, borda definida, superfície farinácea, colônia seca.	<i>Bacillus</i> spp.
BSM 141097	PR 41648	Várzea	Tamanho até 2 mm, cor creme, com o centro amarelo mais escuro e definido, forma arredondada, borda irregular, superfície lisa, colônia úmida.	<i>Bacillus</i> spp
BSM 151097	SP 309908	Várzea	Tamanho aproximado de 2 mm, forma oval a arredondada, centro amarelo e rugoso, borda regular e superfície lisa.	<i>Bacillus</i> spp.
BSM 161097	PE 41192	Várzea	Tamanho aproximado de 5 mm, cor creme com centro rugoso apresentando brilho, forma arredondada e irregular com borda definida, colônia úmida.	<i>Bacillus</i> spp.

Tabela 1. Continuação.

Isolados	Genótipos	Solo	Características morfológicas de colônias	Identificação
BSM 171097	SP 42040	Várzea	Tamanho aproximado de 2 mm, cor creme, forma arredondada, centro enrugado, borda regular, superfície lisa, colônia seca.	ND
BSM 181097	L 5046 F	Cerrado	Tamanho aproximado de 3 mm, cor creme, forma arredondada, com centro definido e arredondado, borda regular e superfície lisa, colônia úmida.	<i>Bacillus</i> spp.
BSM 191097	BR 422	Várzea	Tamanho entre 3 e 6 mm, centro creme, com forma arredondada.	<i>Bacillus</i> spp.
BSM 201097	44196	Várzea	Tamanho aproximado de 2 mm, forma arredondada, com o centro mais escuro, borda lisa, colônia úmida.	<i>Bacillus</i> spp.
BSM 211097	44240	Várzea	Tamanho entre 0,5 e 2 mm, forma arredondada, cor creme, borda irregular, superfície lisa e úmida.	<i>Bacillus</i> spp.
BSM 221097	43469	Várzea	Tamanho de 0,5 a 2 mm, cor creme, forma arredondada, superfície úmida, borda lisa.	<i>Bacillus</i> spp.
BSM 231097	43469	Várzea	Tamanho aproximado de 2,5 mm, cor creme, forma arredondada, densa, borda regular, superfície farinácea e seca	<i>Bacillus</i> spp.
BSM 241097	43150	Várzea	Tamanho aproximado de 1 mm, forma arredondada, com a borda lisa, coloração branca, apresentando brilho, colônia úmida.	<i>Bacillus</i> spp.
BSM 251097	BR 106	Várzea	Tamanho de 1 a 2 mm, forma arredondada, com borda regular e de coloração creme, com o centro bege, colônia úmida.	<i>Bacillus</i> spp.
BSM 261097	41750	Várzea	Tamanho de 0,5 a 1 mm, forma arredondada, cor creme, borda lisa, superfície lisa, colônia úmida	<i>B. Thuringiensis</i>
BSM 271097	43966	Várzea	Tamanho de 2 a 3 mm, forma arredondada, centro creme, com a borda irregular e transparente, superfície farinácea, colônia seca.	<i>B. thuringiensis</i>
BSM 281097	HS 212	Cerrado	Tamanho de 1 a 5 mm, forma arredondada, cor branca, superfície farinácea, borda irregular, colônia seca.	<i>B. thuringiensis</i>
BSM 291097	HS 200	Cerrado	Tamanho de 2 a 4 mm, cor creme, forma arredondada, borda irregular, superfície farinácea, colônia seca.	<i>Bacillus</i> spp.
BSM 301097	HS 200	Cerrado	Tamanho de 0,5 a 2 mm, cor creme, forma arredondada, com o centro amarelo-escuro e a borda amarelo-claro, superfície lisa, colônia úmida.	<i>Bacillus</i> spp.
BSM 311097	HS 205	Cerrado	Tamanho de 3 mm, cor branca, forma arredondada, borda irregular, superfície farinácea, colônia seca.	<i>B. thuringiensis</i>
BSM 321097	1154	Cerrado	Tamanho entre 1 e 4 mm, cor creme, com o centro creme mais escuro, forma arredondada, borda irregular, superfície farinácea, colônia seca.	<i>Bacillus</i> spp.
BSM 331097	HS 211	Cerrado	Tamanho de 4 mm, forma arredondada, borda irregular, cor branca, com o centro bege, superfície farinácea.	<i>Bacillus</i> spp.
BSM 341097	HS 211	Cerrado	Tamanho de 5 a 8 mm, forma alongada (bastão), cor branca e transparente, superfície lisa, úmida e borda lisa	<i>Bacillus</i> spp.

Tabela 1. Continuação.

Isolados	Genótipos	Solo	Características morfológicas de colônias	Identificação
BSM 351097	43630	Várzea	Tamanho de 0,5 a 2 mm, cor creme, com o centro creme mais escuro, forma ovalada, borda lisa, superfície lisa úmida.	<i>Bacillus</i> spp.
BSM 361097	L 262	Cerrado	Tamanho de 0,5 a 2 mm, cor creme, forma ovalada, borda irregular, superfície lisa e úmida.	<i>Bacillus</i> spp.
BSM 371097	L 262	Cerrado	Tamanho variando de 0,4 a 1 mm, cor marrom no centro, circundado por uma faixa amarela, borda com coloração creme, formato de bastão e arredondado, superfície lisa, com o centro deprimido em forma de estrela, borda franjada, colônia úmida.	<i>Bacillus</i> spp.
BSM 381097	L 262	Cerrado	Tamanho aproximado 2 a 5 mm, cor creme, forma ovalada, borda irregular, superfície farinácea e seca.	<i>Bacillus</i> spp.
BSM 391097	L 262	Cerrado	Tamanho aproximado de 3 mm, cor marrom, com a borda creme, formato arredondado e triangular, superfície lisa, borda franjada, colônia úmida.	<i>Bacillus</i> spp.
BSM 401097	HS 206	Cerrado	Tamanho de 3 a 7 mm, cor creme, com o centro creme mais escuro, formato arredondado, superfície lisa, borda irregular, colônia úmida.	<i>Bacillus</i> spp.
BSM 411097	HS 206	Cerrado	Tamanho de 4 mm, cor creme, formato arredondado, superfície farinácea (pontilhado), borda irregular, colônia seca.	<i>Bacillus</i> spp.
BSM 421097	HS 206	Cerrado	Tamanho aproximado de 1 cm, cor creme com o centro creme mais escuro (2 mm), formato arredondado, superfície lisa, borda irregular apresentando transparência, colônia úmida.	<i>Bacillus</i> spp.

ND – Gênero não determinado

**Comunicado  
Técnico, 35**

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,  
PECUÁRIA E ABASTECIMENTO

**GOVERNO  
FEDERAL**

Trabalhando em todo o Brasil

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:  
Embrapa Milho e Sorgo  
Caixa Postal 151 CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG  
Fone: 0xx31 3779 1000  
Fax: 0xx31 3779 1088  
E-mail: sec@cnpmis.embrapa.br

1ª edição  
1ª impressão (2001) Tiragem: 500

**Comitê de  
Publicações**

Presidente: Ivan Cruz  
Secretário-Executivo: Frederico Ozanan Machado Durães  
Membros: Antônio Carlos de Oliveira, Arnaldo Ferreira da  
Silva, Carlos Roberto Casela, Fernando Tavares Fernandes e  
Paulo Afonso Viana

**Expediente**

Supervisor editorial: José Heitor Vasconcelos  
Revisão de texto: Dilermando Lúcio de Oliveira  
Editoração eletrônica: Dilermando Lúcio de Oliveira