

**Embrapa**

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo  
Ministério da Agricultura e do Abastecimento  
Rod. MG 424 km 65 - Caixa Postal 151 35701-970 Sete Lagoas, MG  
Fone (031) 779 1000 Fax (031) 779 1088

CNPMS

# PESQUISA EM ANDAMENTO



PA 31, setembro/98, 3p.

## ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS NÃO PATOGÊNICAS EM MILHO

Wellington Bressan<sup>1</sup>  
Francys Mara Ferreira Vilella<sup>2</sup>  
José Magid Waquil<sup>1</sup>  
Sérvio Túlio Alves Cassini<sup>3</sup>

Entre os fatores ambientais limitantes à cultura do milho, no Brasil, destacam-se as pragas. Em cerca de 30% da área plantada, os agricultores utilizam tratamento de sementes para o controle da pragas iniciais e uma porcentagem ainda menor de produtores protege suas lavouras do ataque da lagarta-do-cartucho através do uso de inseticidas. A prática do manejo integrado de pragas na cultura do milho pressupõe o uso de vários métodos complementares, como o cultural e o biológico. O controle biológico de insetos que atacam as partes aéreas da planta tem sido estimulado, principalmente devido ao maior conhecimento de sua microflora, como os microorganismos endofíticos. Dentro desse grupo estão as bactérias, que têm sido menos estudadas e pouco se conhece sobre a sua diversidade e população nos diferentes tecidos das plantas. Muitas espécies de microorganismos não patogênicos, principalmente bactérias, vivem e se multiplicam na superfície e no interior dos tecidos das plantas. O conhecimento e a manipulação dessa microflora constituem um outro meio que pode ser utilizado para conferir às plantas resistência contra doenças e insetos, principalmente através da manipulação do genoma desses microorganismos endofíticos. A sua habilidade em sobreviver dentro dos tecidos das plantas, com pouca ou nenhuma competição de outros microorganismos, torna essas bactérias um recurso em potencial para o controle biológico como um efeito antagônico contra outros patógenos vasculares ou como vetores de toxinas contra insetos.

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

<sup>2</sup> Bolsista da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

<sup>3</sup> Professor Titular, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.



PA 31, setembro/98, p.2

O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar bactérias endofíticas não patogênicas em milho com potencial para utilização como vetores de toxinas capazes de conferir proteção às plantas de milho contra suas principais pragas.

As bactérias endofíticas foram isoladas de folhas e nervuras, aparentemente sem sintoma fitopatológico, de 12 cultivares de milho : Z8452, AG 5011, A 2014, C 435, C 805, Br 201, Br 205, Br 3123, CMS 54, CMS 61, Zélia e XHT12, pertencentes ao Ensaio Nacional de Milho, na Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, MG. As folhas de milho foram desinfestadas superficialmente por imersão em álcool 70%, hipoclorito de sódio 3% e sucessivas lavagens com água destilada esterilizada. Após a desinfestação, as folhas foram cortadas em pedaços de 1 cm<sup>2</sup> e as nervuras foliares em segmentos de 3 mm; em seguida, foram plaqueadas em placas Petri contendo os meios de cultura D<sub>2</sub> e Manitol e incubadas a 28 °C, para o desenvolvimento e crescimento das colônias, as quais foram purificadas e mantidas em culturas estoques. A capacidade dos isolados de bactérias colonizarem a planta, via semente, foi testada com 160 isolados, pela técnica de inoculação na sementes e reisolamento nas folhas.

A avaliação do potencial patogênico dos isolados recuperados nas folhas foi efetuada por seccionamento da parte aérea e inoculação com o isolado.

O número de isolados variou de acordo com o genótipo do milho e com o meio de cultura utilizado, totalizando 750 isolados (Figura 1). As variações no número de isolados obtidos nas plantas dos diferentes genótipos de milho podem ser atribuídas ao meio de cultura e às características próprias da relação endófito-planta. Em relação aos meios de cultura utilizados, o maior número de isolados foi encontrado quando os segmentos de folhas e nervuras foram plaqueados em meio D<sub>2</sub>, verificando-se que em todas as cultivares de milho foram obtidos isolados bacterianos, enquanto em Meio Manitol não foram obtidos isolados nas cultivares A 2014, AG 5011 e Br 3123, possivelmente devido à composição desse meio, que não favoreceu o desenvolvimento de determinados grupos de bactérias. O maior número de isolados foi obtido nas nervuras foliares, indicando que essas bactérias endofíticas encontram-se em íntima associação com os vasos xilemáticos, já que os mesmos contêm os nutrientes essenciais para o favorecimento da colonização e permanência dessas bactérias endofíticas na planta hospedeira. Dos 160 isolados inoculados nas sementes, 14 foram reisolados nas folhas, indicando que esses isolados foram capazes de romper as barreiras naturais da semente e colonizar os tecidos internos das plantas de milho. Dessas bactérias, 60% apresentaram a forma de cocos, 40% a forma de bacilos e 95% foram gram positivas. Todos os isolados recuperados nas folhas não apresentaram efeito patogênico nas plantas de milho.

Os resultados demonstram que os tecidos internos das folhas e nervuras favorecem o desenvolvimento de uma diversidade de bactérias endofíticas e que essas bactérias podem, ainda, ser utilizadas como vetores no controle biológico. Entretanto, as relações endófito-planta não estão ainda bem estabelecidas e o impacto ecológico e fisiológico do uso dessas bactérias para transformação deve ser avaliado.

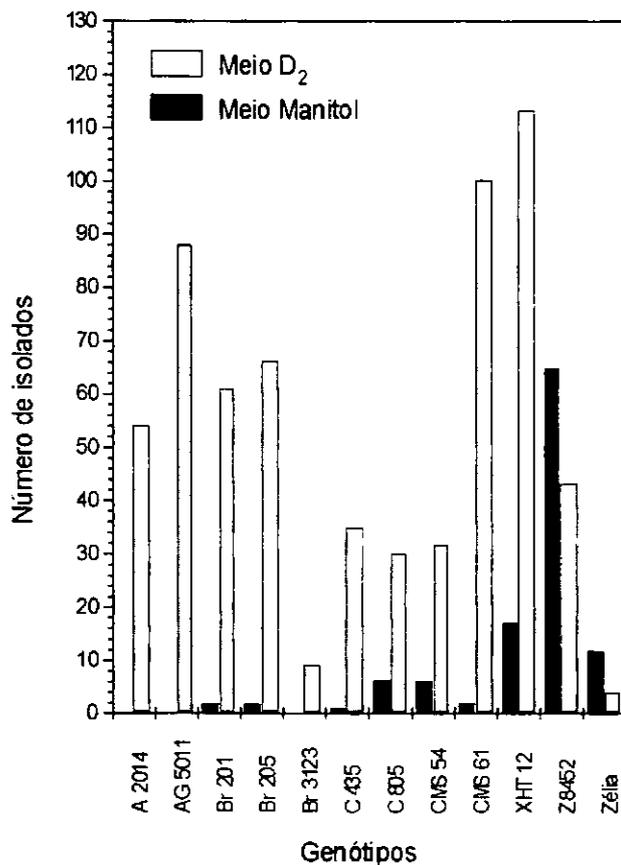


FIGURA 1. Número de isolados de bactérias em genótipos de milho em meios de cultura.