ISOLAMENTO DE *Bacillus* spp. ENDOFÍTICOS DE MANDIOCA(*Manihot esculenta* Crantz)

Piza, A. C. M. T.[1]; Capalbo, D. M. F.[2]; Sousa, C. P.[1,3]; Melo, I. S.[2]; Suzuki, M. T.[4,5]
ninasanca@gmail.com
[1]*Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPG-Biotec/UFSCar);* [2]*Embrapa - Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente;* [3]*Departamento de Morfologia e Patologia (DMP/CCBS/UFScar);* [4]*Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia (USP/SP);* [5]*Departamento de Genética (LGN/ESALQ)*

Endofíticos são entidades microbianas que passam pelo menos um período do seu ciclo de vida albergados no interior de uma planta sem causar danos aparentes ao seu hospedeiro (Hallmann et al.,1997; Petrini, 1991) ou desenvolvendo uma relação simbiótica (Owen and Hundley, 2004). Estudos moleculares (Rosenblueth e Martinez-Romero, 2006) com endofíticos, revelaram riqueza de espécies promovendo crescimento vegetal, controle de patógenos, remoção de contaminantes, solubilização de fosfato e assimilação de nitrogênio. Alguns produzem metabólitos secundários de interesse biotecnológico (Cerigioli, 2005). Apesar do potencial produtor de compostos bioativos, poucos trabalhos têm sido conduzidos neste escopo (Hasegava, 1983; Fisher et al., 2003; Serrano et al., 2007; Ratti et al., 2007). Este trabalho objetivou isolar bactérias endofíticas do gênero *Bacillus* em variedades comerciais e emovariedades de mandioca cultivadas em São Paulo, Amazonas e Bahia. Enfatizou-se o isolamento e identificação de *B. thuringiensis* (Bt) endofítico devido à sua produção de cristais protéicos tóxicos a larvas de insetos.

As amostras vegetais aéreas e terrestres (raízes, caules e folhas) de mandioca foram coletadas aleatoriamente. Os controles de desinfecção foram efetuados utilizando-se alíquotas de 0,1 mL da última água destilada esterilizada, inoculados e incubados (48 h/ 28°C).

Mini fragmentos (0,5 – 0,7cm) de cada região da planta foram semeados em triplicata em placas de Petri (7 fragmentos por placa) de Tryptone Soy Agar (TSA), suplementado com 1000 µL mL^{-1} de fungicida benomil e incubadas (25°C /20 d) (Araújo et al., 2002). A avaliação e registro foram realizados a partir do segundo dia de crescimento bacteriano, com intervalos de 2 a 5 dias.

Purificações das colônias isoladas dos tecidos vegetais foram realizadas por esgotamento. As culturas puras foram mantidas em ágar nutriente (50%), cobertas com óleo mineral. Os microrganismos foram agrupados de acordo com características fenotípicas (macroscopia colonial e coloração de Gram) e a natureza das membranas celulares dos isolados identificadas (perfil de ácidos graxos) de acordo com Sasser (2001).

Das 55 linhagens de microrganismos endofíticos de raiz, maniva e folha de mandioca o gênero *Bacillus* spp. foi detectado em 47%, 33% e 20% das amostras isoladas dos estados de São Paulo, Bahia e Amazonas, respectivamente (Tabela 1). Na Bahia (Tabela 2), *B. thuringiensis*, foi a espécie mais representativa (57%) e no Amazonas (7%) detectou-se o menor percentual. O habitat associado à planta é um ambiente dinâmico onde muitos fatores podem afetar a estrutura e composição de espécies das comunidades bacterianas que colonizam os tecidos de plantas, o que pode justificar as diversidades percentuais de isolamentos observados nos estados estudados.

As espécies endofíticas do gênero *Bacillus* encontradas albergadas em partes da mandioca, neste trabalho, foram: *B. cereus, B. megaterium, B. lentimorbus, B.subtilis, B. pumilus, B. anthracis, B. sphaericus, B. thuringiensis*. Na mesma cultura vegetal, Teixeira et al., (2007) identificaram essas espécies em diferentes proporções. Dentre as bactérias identificadas, Bt ainda é pouco descrita como endofítica (Tabelas 2 e 3). A produção de cristal protéico, tóxico para lagartas, caracteriza essa espécie, tornando essa bactéria a mais utilizada como agente de controle biológico na agricultura (Bobrowski et al., 2003). A raiz albergou 86% dos Bt identificados (Tabela 2), provavelmente pela presença de nutrientes concentrados nesta região.

Esse é um dos primeiros relatos da detecção de Bt como endófito de plantas.Com o isolamento de um Bt endofítico, surgem novas perspectivas para o controle de larvas de insetos praga que vivem e/ou se alimentam no interior das plantas.Uma vez estabelecida a capacidade dessa bactéria controlar insetos no interior da planta, certamente poderá haver uma diminuição do uso de plantas transgênicas.