

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON**

KATIA KABROSKI ANDRIOLI

**OCORRÊNCIA DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ASSOCIADAS À QUINOA COM
POTENCIAL DE PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE PLANTAS**

MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PARANÁ

2016

KATIA KABROSKI ANDRIOLI

**OCORRÊNCIA DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ASSOCIADAS À QUINOA COM
POTENCIAL DE PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE PLANTAS**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, para obtenção do título de Magister Scientiae.

Orientador: Dr. Edmar Soares de Vasconcelos
Coorientador: Dra. Elisiane Inês Dall'Óglio Chaves
Coorientador: Dr. Vandeir Francisco Guimarães

MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PARANÁ

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

A573o

Andrioli, Katia Kabroski

Ocorrência de bactérias endofíticas associadas à quinoa com potencial de promoção do crescimento de plantas. Katia Kabroski Andrioli. Marechal Cândido Rondon, 2016.
70 p.

Orientador: Prof. Dr. Edmar Soares de Vasconcelos
Coorientadora: Prof. Dr. Elisiane Inês Dall'Oglio Chaves
Coorientador: Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná,
Campus de Marechal Cândido Rondon, 2016
Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Agronomia

1. *Chenopodium quinoa*. 2. AIA. 3. Solubilização de fosfato. 4. Caracterização fenotípica. I. Vasconcelos, Edmar Soares de. II. Chaves, Elisiane Inês Dall'Oglio. III. Guimarães, Vandeir Francisco. IV. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. V. Título.

CDD 21.ed. 633.1
CIP-NBR 12899

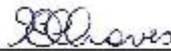
Ficha catalográfica elaborada por Helena Soterio Beijo – CRB 97985

KATIA KABROSKI ANDRIOLI

OCORRÊNCIA DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ASSOCIADAS À QUINOA
COM POTENCIAL DE PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE PLANTAS

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual do Oeste do
Paraná, como parte das exigências
do Programa de Pós-Graduação em
Agronomia, para obtenção do título
de Magister Scientiae.

APROVADA: 23 de fevereiro de 2016



Prof.ª. Dr.ª. Elisiane Inês Dall'Oglio Chaves
(PUC)



Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães
(Coorientador)
(UNIOESTE)



Prof. Dr. Edmar Soares de Vasconcelos
(Orientador)
(UNIOESTE)



Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46
Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>
Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000
Marechal Cândido Rondon - PR.



PARANÁ
GOVERNO DO ESTADO

Ata da reunião da Comissão Julgadora da Defesa de Dissertação da Bióloga **KATIA KABROSKI ANDRIOLI**. Aos vinte e três dias do mês de fevereiro de 2016, às 14h30min, sob a presidência do Prof. Dr. Edmar Soares de Vasconcelos, em sessão pública, reuniu-se a Comissão Julgadora da Defesa da Dissertação da Bióloga Katia Kabroski Andrioli, discente do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Nível Mestrado e Doutorado com área de concentração em **"PRODUÇÃO VEGETAL"**, visando à obtenção do título de **"MESTRA EM AGRONOMIA"**, constituída pelos membros: Prof^a. Dr^a. Elisiane Inês Dall'Óglio Chaves (PUC); Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães (Coorientador) e Prof. Dr. Edmar Soares de Vasconcelos (Orientador).

Iniciados os trabalhos, a candidata apresentou seminário referente aos resultados obtidos e submeteu-se à defesa de sua Dissertação, intitulada: **"Ocorrência de bactérias endofíticas associadas à quinoa com potencial de promoção do crescimento de plantas"**.

Terminada a defesa, procedeu-se ao julgamento dessa prova, cujo resultado foi o seguinte, observada a ordem de arguição:

Prof^a. Dr^a. Elisiane Inês Dall'Óglio Chaves.....Aprovado
Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães (Coorientador).....Aprovado
Prof. Dr. Edmar Soares de Vasconcelos (Orientador).....Aprovado

Apurados os resultados, verificou-se que a candidata foi habilitada, fazendo jus, portanto, ao título de **"MESTRA EM AGRONOMIA"**, área de concentração em **"PRODUÇÃO VEGETAL"**. Do que, para constar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos senhores membros da Comissão Julgadora.

Marechal Cândido Rondon, 23 de fevereiro de 2016.

Prof^a. Dr^a. Elisiane Inês Dall'Óglio Chaves

Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães
(Coorientador)

Prof. Dr. Edmar Soares de Vasconcelos
(Orientador)

*Dedico a minha família e, em especial ao meu
marido Alexandre Andrioli que sempre me
incentivaram. Dedico a Deus, sem Ele nada é
possível.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida e por ajudar a realizar meus sonhos e por me fortalecer nos momentos difíceis. Sem Ele a realização de mais essa etapa da minha vida não teria chegado até este momento. Realmente, não foi fácil concluir, mas sem esforço não é possível atingir os objetivos.

A Pontifícia Universidade Católica do Paraná, PUCPR, Campus Toledo, por ter me acolhido e permitido que eu pudesse desenvolver minha pesquisa em suas instalações. Tenho essa universidade como minha casa e me sinto fazendo parte de sua história, assim como a PUC faz parte da minha.

Ao meu orientador, Edmar Soares de Vasconcelos, que sempre esteve disponível para tirar minhas dúvidas e me ajudar. Você acreditou em mim sem me conhecer e apostou sua proposta de pesquisa aos meus conhecimentos. Por isso, tive que me esforçar ainda mais e mostrar que poderíamos chegar até este ponto.

A minha coorientadora, Elisiane Inês Dall'Óglio Chaves, por me socorrer em muitos momentos, desde a me ensinar até apenas me ouvir. Você é minha mentora e me apresentou a esta linha de pesquisa, mas acima de tudo você é uma grande amiga que quero ter sempre por perto.

Ao meu coorientador Vandeir Francisco Guimarães por sempre exigir um pouco mais de mim. O meu aprendizado foi muito grande e te agradeço por isso.

Ao professor Nelson Fernandes da UFPR, Campus de Palotina, professora Patrícia Ghezzi da PUCPR Toledo, e aos professores do PPGA José Renato Stangarlin e Odair José Kuhn pelos ensinamentos essenciais para o desenvolvimento de minha pesquisa.

Ao meu amado marido Alexandre Andrioli pelo apoio, pela confiança e acima de tudo pelo amor. O carinho, a preocupação de ir todos os dias para a estrada, e quando eu chegava em casa você estava esperando por mim. Tudo isso é insubstituível.

Aos meus pais, Gracina e Claudio Kabroski e meus irmãos, Karina e Delson por sempre acreditarem em mim.

Aos meus sogros, Neusa e Sadi Andrioli que sempre estavam preocupados comigo e me apoiaram nesse árduo caminho.

Agradeço do fundo do meu coração, às minhas amigas e companheiras, Daiana Karoline Kaiser, Laura Cristiane Nascimento de Freitas, Carla Rosane Kosmann por todos os momentos que passamos juntas, pelas madrugadas trabalhando, pelas risadas e pelo crescimento profissional. Com certeza, sem vocês, essa jornada teria sido muito mais difícil.

A todos os colegas que conheci nas aulas porque todos se mostraram solidários quando mais precisei.

A colega Camila Gazolla que conheci ao longo do caminho e que esteve prontamente disponível para me ajudar.

Aos laboratoristas da PUCPR Campus Toledo que foram sempre solícitos e me acolheram com carinho em suas instalações.

Enfim, a todos que passaram pela minha vida nos últimos dois anos e de alguma forma me ajudaram nessa caminhada. Sozinho tudo é mais difícil e o fardo é muito maior. O aprendizado foi enorme e agradeço a UNIOESTE pela oportunidade de enriquecer o meu conhecimento.

De coração, meus mais sinceros agradecimentos.

“Eu tentei 99 vezes e falhei, mas na centésima tentativa eu consegui. Nunca desista de seus objetivos mesmo que esses pareçam impossíveis, a próxima tentativa pode ser a vitoriosa.”

(Albert Einstein)

RESUMO

ANDRIOLI, Katia Kabroski, M. S., Universidade Estadual do Oeste do Paraná, fevereiro de 2016. **Ocorrência de bactérias endofíticas associadas à quinoa com potencial de promoção do crescimento de plantas.** Orientador: Prof. Dr. Edmar Soares de Vasconcelos. Coorientadores: Profa. Dra. Elisiane Inês Dall'Óglio Chaves e Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães

A quinoa é um alimento que tem recebido grande importância devido a seu alto valor nutricional em proteínas e aminoácidos. Bactérias endofíticas vivem no interior dos tecidos de plantas e promovem benefícios diretos e indiretos para as plantas. Em quinoa, a associação das bactérias endofíticas ainda não tinha sido estudada. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ocorrência de bactérias endofíticas com potencial de promoção de crescimento vegetal associadas a plantas de quinoa. As sementes de quinoa foram semeadas em solo agricultável e de floresta nos municípios de Entre Rios do Oeste e Toledo. O isolamento foi realizado aos 40 dias após a germinação das sementes, utilizando-se raízes de quinoa como iscas. Diluições de 10^{-2} a 10^{-7} foram plaqueadas em meios sólidos e inoculadas em meios semissólidos, ambos semi-seletivos e isentos de nitrogênio. A partir dos meios de cultura semissólidos ainda, foi realizada a contagem empregando-se o método do Número Mais Provável (NMP). O teste de solubilização de fosfato e produção do fitohormônio ácido indolacético (AIA) dos isolados foi realizado para caracterização da promoção de crescimento vegetal. Foram obtidas 130 colônias de bactérias endofíticas, destas, sete a partir dos meios semissólidos. O NMP variou de não detectado a $1,5 \times 10^5$ células g^{-1} de raiz. Da caracterização fenotípica observou-se grande diversidade morfológica com a formação de 14 grupos a 70% de dissimilaridade. Todas as bactérias produziram AIA em maior ou menor quantidade, com variação de 0,90 a $63,42 \mu g mg^{-1}$ de proteína. No entanto, apenas 40% dos isolados apresentou halo de solubilização de fosfato. A caracterização morfofisiológica possibilitou agrupar os isolados de traços semelhantes e os testes de promoção de crescimento identificaram os isolados promissores para testes a campo.

Palavras-chave: *Chenopodium quinoa*, AIA, solubilização de fosfato, caracterização fenotípica.

ABSTRACT

ANDRIOLI, Katia Kabroski, M. S., Universidade Estadual do Oeste do Paraná, February 2016. Occurrence of endophytic bacteria associated to quinoa with potential for plant-growth-promoting. Advisor: Dr. Edmar Soares de Vasconcelos. Co-Advisors: Dra. Elisiane Inês Dall'Óglio Chaves and Dr. Vandeir Francisco Guimarães.

Quinoa is a food crop that has received great importance for the high nutritional value in proteins and amino acids. Endophytic bacteria inhabit the interior of plant tissues and promote direct and indirect benefits to plants. The association between quinoa and endophytic bacteria has not been studied. The aim of this study was to evaluate the occurrence of endophytic bacteria with potential for plant growth promotion associated with quinoa plants. The quinoa seeds were seeding in arable and forest soil in Entre Rios do Oeste and Toledo. The isolation was done 40 days after the seed germination, using quinoa roots as baits. The 10^{-2} to 10^{-7} dilutions were plated on solid media and inoculated into semi-solid media, both semi-specific and N-free. From the semi-solid media, the count was performed employing the method of the Most Probable Number (MPN). The phosphate solubilization test and the indol-acetic acid (IAA) phytohormone production in the isolates were performed to characterize the plant growth promoting. We obtained 130 colonies of endophytic bacteria, these, seven from the semi-solid media. The MPN ranged from not detected to $1,5 \times 10^5$ cells per g^{-1} root. We observed a large morphological diversity from the phenotypic characterization and there was the formation of 14 groups to 70% of dissimilarity. All bacteria produced IAA in greater or lesser amount with the range of 0.90 to $63.42 \mu\text{g mg}^{-1}$ of protein. However, only 40% of the isolates showed phosphate solubilization halo. The morphophysiological characterization enabled to group the isolates with similar traits and the growth promotion tests have identified promising isolates for field tests.

Keywords: *Chenopodium quinoa*, IAA, phosphate solubilization, phenotypic characterization.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II - Isolamento e caracterização fenotípica de bactérias endofíticas na cultura da quinoa.....35

Figura 1. Locais de coleta das raízes de plantas isca de quinoa em Entre Rios do Oeste/PR39

Figura 2. Locais de coleta de raízes de plantas isca de quinoa em Toledo/PR39

Figura 3. Características morfofisiológicas das colônias avaliadas em relação à alteração do pH no meio de cultura (pH), coloração (COR), forma (FOR), borda (BOR), elevação (ELE), superfície (SUP), detalhes ópticos (DOP) e consistência (CONS), referente aos isolados das áreas de Entre Rios do Oeste e Toledo, estado do Paraná, entre outubro e dezembro de 2014.44

Figura 4. Dendograma de dissimilaridade morfofisiológica de 130 isolados provenientes de diferentes solos de Entre Rios do Oeste e Toledo, estado do Paraná, entre outubro e dezembro de 2014, e das cepas referência, *H. seropedicae* (HB-132) e *A. brasilense* (AZ-131).47

CAPÍTULO III – SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO E PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOLÁCETICO *IN VITRO* POR BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS53

Figura 1. Isolados distribuídos por capacidade de solubilização de fosfato nas áreas avaliadas. AER: Agricultável de Entre Rios do Oeste; ATO: Agricultável de Toledo; FTO: Floresta de Toledo; FER: Floresta de Entre Rios do Oeste.....63

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II - Isolamento e caracterização fenotípica de bactérias endofíticas na cultura da quinoa.....35

Tabela 1. Análise físico-química da camada 0-20 cm dos solos utilizados no cultivo da quinoa nos municípios de Entre Rios do Oeste e Toledo, estado do Paraná, em setembro de 2014.....40

Tabela 2. Contagem de bactérias diazotróficas endofíticas pela técnica do Número Mais Provável (NMP) nas áreas de Entre Rios do Oeste e Toledo, estado do Paraná, entre outubro e dezembro de 201445

CAPÍTULO III – SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO E PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOLÁCETICO *IN VITRO* POR BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS53

Tabela 1. Produção de Ácido Indolacético (AIA) e solubilização de fosfato das estirpes bacterianas isoladas nas áreas Agricultável e de Floresta de Entre Rios do Oeste/PR entre outubro e dezembro de 201460

Tabela 2. Produção de Ácido Indolacético (AIA) e solubilização de fosfato das estirpes bacterianas isoladas nas áreas Agricultável e de Floresta de Toledo/PR entre outubro e dezembro de 2014.....61

SUMÁRIO

RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	15
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 A CULTURA DA QUINOA	17
2.2 BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL.....	18
2.3 SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO.....	22
2.4 PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOLACÉTICO (AIA).....	23
2.5 DIVERSIDADE FENOTÍPICA DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS.....	25
2.6 MICRORGANISMOS ASSOCIADOS ÀS RAÍZES DE QUINOA.....	27
3 REFERÊNCIAS.....	29
CAPÍTULO II - ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS NA CULTURA DA QUINOA	35
RESUMO.....	35
ABSTRACT	36
1 INTRODUÇÃO.....	37
2 MATERIAL E MÉTODOS	39
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4 CONCLUSÕES.....	49
5 REFERÊNCIAS	50
CAPÍTULO III – SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO E PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOLÁCETICO <i>IN VITRO</i> POR BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS.....	53
RESUMO.....	53
ABSTRACT	54
1 INTRODUÇÃO.....	55
2 MATERIAL E MÉTODOS	57
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59

4 CONCLUSÕES.....	66
5 REFERÊNCIAS	67
CAPÍTULO IV - CONSIDERAÇÕES FINAIS	70

CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

O interesse na utilização de microrganismos na agricultura tem aumentado significativamente nas últimas décadas devido a maior conscientização sobre a conservação ambiental. Os microrganismos podem ter diversas finalidades, principalmente a redução no uso de insumos químicos (SOUZA, 2001).

Uma das principais associações entre microrganismos e plantas envolve as bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN) e as bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCPs). O nitrogênio (N) é o elemento mais abundante na atmosfera, porém indisponível às plantas, o que torna necessária sua adição ao solo pelo uso de fertilizantes (SALA; FREITAS; SILVEIRA, 2007). Por outro lado, as bactérias diazotróficas tem a capacidade de fixação do nitrogênio atmosférico e quando associadas a plantas não leguminosas podem ser agrupadas em três categorias: organismos rizosféricos, endofíticos facultativos e endofíticos obrigatórios (BALDANI et al., 1997).

As bactérias diazotróficas associadas a plantas não leguminosas podem ser consideradas como bactérias promotoras de crescimento de plantas, uma vez que são capazes de promover benefícios às plantas, não exclusivamente pela fixação biológica de nitrogênio (FBN) (SALA; FREITAS; SILVEIRA, 2007).

A associação entre BPCPs e plantas tem sido amplamente estudada em sorgo (BERGAMASCHI et al., 2007); arroz (ISLAM et al., 2009; SILVA et al., 2004); milho (PEDRINHO et al., 2010; ROESCH et al., 2007), canola (FARINA et al., 2012), contudo a relação entre quinoa e microrganismos endofíticos ainda requer pesquisa.

Atualmente, a quinoa é considerada um dos grãos mais nutritivos e foi classificada como um dos melhores alimentos de origem vegetal para os seres humanos. A proteína da quinoa equilibrada com aminoácidos essenciais como a lisina, desempenha importante papel no desenvolvimento do cérebro e crescimento. Além disso, contém vitaminas e minerais como niacina, cálcio, fósforo e ferro (CARRASCO; SOTO, 2010).

A quinoa é um produto relativamente novo no mercado internacional, com grande potencial para a expansão da produção e comércio. A demanda mundial é

esperada para continuar crescendo vigorosamente nos próximos anos, impulsionada principalmente pelos países desenvolvidos, onde as despesas com alimentos mais saudáveis e naturais é uma tendência ascendente. Em outras partes do mundo, há um potencial interessante para a introdução de quinoa como uma nova cultura, dada a sua capacidade de resistência e baixa necessidade de água (KRIVONOS, 2013).

No Brasil, pesquisas com a cultura de quinoa iniciaram na década de 1990, como parte do esforço para diversificar o sistema de produção em áreas agricultáveis no cerrado (BORGES et al., 2010). A expansão das áreas de produção tem ocorrido e desta forma, busca-se os genótipos melhor adaptados às condições edafoclimáticas de cada região.

Mesmo na Bolívia, onde a quinoa representa grande parte da produção mundial, há pouca pesquisa sobre a eficiência de uso do nitrogênio na cultura. No entanto, sabe-se que a quinoa possui grande exigência de nitrogênio assim como em outras culturas. O nitrogênio no solo e nas plantas deve ser sempre estudado e avaliado para incrementar o potencial produtivo e a qualidade dos produtos agrícolas (CASAS, 2012). A conversão da forma inorgânica para orgânica é realizada pelos microrganismos do solo que liberam ou mineralizam nutriente como resultado de sua atividade nutricional.

Desta forma, acredita-se que bactérias promotoras de crescimento de plantas atuam no desenvolvimento e auxiliam no incremento de produtividade da quinoa, no entanto, apesar de sua relevância, as pesquisas com esse propósito são muito escassas. Logo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ocorrência de bactérias endofíticas com potencial de promoção de crescimento vegetal associadas a plantas de quinoa.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A CULTURA DA QUINOA

A quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) pertencente à família Amaranthaceae, possui como centro de diversidade a região andina na América do Sul, sendo um alimento cultivado há mais de 7000 anos pela população inca. No passado, era cultivada desde o norte da Colômbia até o sul do Chile, passando pelas mais diversas altitudes, desde o nível do mar até 4000 metros, mas a melhor produção é atingida em altitudes que variam de 2500 a 3800 m com precipitação anual entre 250 e 500 mm. Pode ser cultivada desde solos argilosos até arenosos, desde que possuam boa drenagem (PERALTA et al., 2012; MUJICA; JACOBSEN, 2006).

Atualmente, a Bolívia é o maior produtor da América Latina atendendo aos mercados americano e europeu (MUJICA; JACOBSEN, 2006), sendo que a produção de quinoa da Bolívia e Peru, somadas, representam 90% da produção mundial. Recentemente, o cultivo da quinoa tem se expandido para os Estados Unidos e em menor quantidade em alguns países da Europa e África (KRIVONOS, 2013).

A quinoa é considerada uma planta rústica, que apresenta tolerância à seca, frio e salinidade. Esta rusticidade foi adquirida ao longo de um processo evolutivo lento e complexo que foi mantido pelos agricultores andinos e permitiu a conservação dos recursos genéticos primitivos (JACOBSEN; MUJICA, ORTIZ, 2003).

A quinoa é uma espécie granífera (SPEHAR; SANTOS, 2002) que apresenta caule ereto, raiz pivotante profunda e bastante ramificada. As folhas mais jovens possuem glândulas de oxalato de cálcio (CASAS, 2012) que possibilita reter umidade, característica desejável na tolerância à seca (SPEHAR; SANTOS, 2002). Como possui grande diversidade genética, apresenta características morfológicas muito variáveis, desde a planta que alcança tamanho de 0,3 a 2 m, o grão varia de 1,2 a 2,7 mm de diâmetro, a panícula pode variar de 15 a 70 cm. As sementes podem ser creme, branca, amarela, vermelha, roxa ou preta, que variam em função do pericarpo (REPO-CARRASCO et al., 2007). Nesse tecido encontra-se também a

saponina, glicosídeo de sabor amargo que limita a utilização direta do grão (SPEHAR; SANTOS, 2002).

A quinoa possui alto valor nutritivo, e se destaca pela proteína de qualidade, que pode ser comparada à caseína do leite e não contém as proteínas que formam o glúten. Adiciona-se ainda o fato de sua capacidade de ser transformada em uma grande gama de produtos (JACOBSEN; MUJICA; ORTIZ, 2003). Possui propriedades nutritivas, ácidos graxos poli-insaturados e alto conteúdo em minerais. Pode ser utilizada tanto na alimentação humana, quanto para a produção de aves e suínos (SPEHAR, 2006).

Por suas características alimentares ímpares, a quinoa tem recebido atenção mundial como alimento funcional, por se tratar de um grão integral que é benéfico à saúde, quando consumido regularmente. O teor de amido representa de 52% a 60% do peso da semente, que pode ser consumida cozida como arroz, na forma de farinha ou flocos (ISHIMOTO; MONTEIRO, 2010; BORGES et al., 2010).

No Brasil, foi introduzida no cerrado na década de 1990 e têm sido alvo de melhoramento genético e já figura como uma alternativa viável de sucessão no sistema de plantio direto (SPEHAR; SANTOS, 2002). A linhagem BRS Syetetuba desenvolvida por técnicas de melhoramento genético a partir de sementes originárias do Equador teve uma progênie selecionada que apresentou as principais características desejáveis, como ausência de saponina e grãos grandes, além de número de dias para maturação em torno de 120, arquitetura da planta e rendimento de grãos de aproximadamente 2,3 t ha⁻¹ (SPEHAR; ROCHA; SANTOS, 2011).

2.2 BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL

As bactérias endofíticas, encontradas no interior dos tecidos das plantas, podem estar associadas e promover seu crescimento. De acordo com seu modo de vida, as bactérias endofíticas podem ser classificadas como obrigatórias ou facultativas. As endofíticas obrigatórias são estritamente dependentes da planta para seu crescimento e sobrevivência, enquanto as facultativas têm um estágio de seu ciclo de vida no qual permanecem livres no solo (HARDOIM; OVERBEEK; ELSAS, 2008). As bactérias endofíticas têm papel fundamental nos processos de fixação de nitrogênio e promoção de crescimento.

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um processo de aproveitamento de nitrogênio atmosférico (N_2) que envolve interações complexas entre bactérias diazotróficas e plantas superiores que podem garantir o suprimento desse nutriente para o solo (YIM et al., 2009). As bactérias diazotróficas ou fixadoras de nitrogênio convertem o N_2 em uma forma disponível para assimilação das plantas, a amônia. Isso ocorre, porque essas bactérias possuem um complexo enzimático chamado de nitrogenase que rompe a tríplice ligação entre as moléculas de N (REIS; TEIXEIRA, 2005).

As bactérias diazotróficas podem ser consideradas como promotoras de crescimento vegetal, um grupo de bactérias que exibem efeitos benéficos sobre o crescimento e produtividade de plantas (YIM et al., 2009). As bactérias benéficas podem ser endofíticas, ou seja, habitam o interior dos tecidos das plantas, ou de vida livre no solo. Ambas podem ser promotoras de crescimento vegetal, de forma direta ou indireta. A promoção do crescimento indireta ocorre quando as BPCV diminuem ou previnem os efeitos deletérios de um ou mais organismos fitopatogênicos. A promoção de crescimento direta implica em proporcionar à planta um composto que é sintetizado pela bactéria, como fitohormônios ou facilitando a absorção de certos nutrientes como de N ou fósforo (P) a partir do ambiente (LODEWYCKX et al., 2002).

A promoção de crescimento direta pode ser induzida de várias formas. As bactérias endofíticas têm um elevado potencial para aumentar a produtividade por meio da fixação biológica de nitrogênio e promoção de crescimento, neste último caso, aumentando a absorção de água e nutrientes pelas plantas (IKEDA et al., 2012) por meio da produção de fitohormônios, principalmente auxinas. Além disso, pode sintetizar sideróforos que solubilizam e sequestram ferro do solo, e a solubilização de fósforo, deixando estes minerais disponíveis para as plantas (LODEWYCKX et al., 2002).

Glick, Penrose e Li (1998) demonstraram que as BPCV possuem a enzima ACC deaminase, o que pode estimular o crescimento das plantas. Esta enzima modula os níveis de etileno das plantas em desenvolvimento. O etileno está envolvido em diversas etapas do desenvolvimento das plantas, desde a formação de raízes e pêlos radiculares, na indução de expansão lateral de células, até o amadurecimento dos frutos e abscisão das folhas, além de estar envolvido nas respostas de defesa contra a infecção de patógenos (TAIZ; ZIEGER, 2009). A

metionina é o precursor do etileno e o ACC (1-aminociclopropano-1-carboxílico) funciona como um intermediário na conversão da metionina em etileno. Desta forma, a ACC deaminase atua aumentando os níveis de etileno nas plantas em desenvolvimento ou estressadas, o que pode melhorar sua estrutura através do alongamento de suas raízes, e por consequência ser considerado como um promotor de crescimento.

A promoção de crescimento de forma indireta está relacionada à colonização de BPCV em raízes de plantas ao reduzir doenças por competição. A atividade antifúngica de diversas bactérias endofíticas isoladas de arroz foi demonstrada contra *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* em maior ou menor grau de inibição (JI; GURURANI; CHUN, 2014). Isolados de *Ochrobactrum* sp. apresentaram ação antagônica sobre os fungos *Fusarium semitectum*, *F. oxysporum*, *Cercospora kikuchii* e dois isolados do gênero *Bacillus* apresentaram efeito antagonista a *F. oxysporum* com diferentes tipos de interação (ASSUMPÇÃO et al., 2009).

Provavelmente todas as plantas possuam microrganismos endofíticos, sendo que uma mesma planta pode abrigar vários deles (AZEVEDO, 1998). Alguns gêneros de bactérias são encontrados em maior quantidade nas plantas, outras em menor quantidade e são mais difíceis de isolar. Gardner, Feldman e Zablutowicz (1982) observaram a existência e distribuição de bactérias em limoeiros. Nesse estudo foram identificados 13 gêneros, dos quais 40% eram *Pseudomonas* e 18% *Enterobacter*, sendo considerados os gêneros predominantes, enquanto os demais foram classificados como raros.

O estudo da diversidade é considerado uma das condições mais importantes para o estabelecimento de um ecossistema (LODEWYCKX et al., 2002). A diversidade da composição da comunidade bacteriana é orientada, provavelmente, por eventos aleatórios, porém determinada por diversos fatores. A composição do solo, as condições ambientais, assim como a abundância, o estado fisiológico e a distribuição inicial das bactérias endofíticas irá determinar a colonização (HARDOIM; OVERBEEK; ELSAS, 2008).

O estudo das interações entre planta e microrganismos vem se intensificando nos últimos anos, com o intuito de entender os vários fatores envolvidos e utilizando isso para a seleção de estirpes de bactérias eficientes na promoção de crescimento das grandes culturas (FERREIRA; KNUPP; MARTIN-DIDONET, 2014).

Ao longo dos anos, diversas bactérias promotoras de crescimento foram descobertas como *Beijerinckia fluminensis* e *Azotobacter paspali* (rizosféricas), *Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense* (associativas) e *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Burkholderia brasilensis* e *B. tropica* (endofíticas). Estudos de inoculação com bactérias diazotróficas mostraram que as bactérias diazotróficas endofíticas têm um maior potencial de contribuição na FBN do que as associativas (BALDANI; BALDANI, 2005). *Gluconacetobacter diazotrophicus*, uma bactéria diazotrófica endofítica demonstrou promover o crescimento em plantas de cana-de-açúcar, possivelmente, por sua capacidade de colonizar e fixar N₂ no interior dos tecidos, além de ter efeitos positivos na sobrevivência de plântulas, no comprimento e volume radicular (RODRIGUES et al., 2007).

No entanto, grande parte das pesquisas com bactérias está concentrada no gênero *Azospirillum*, porém há uma grande diversidade de bactérias ainda pouco exploradas e outras ainda para serem descobertas. É importante promover o conhecimento de novas espécies e aprofundamento do potencial de bactérias pouco estudadas em busca de tecnologias com vistas à agricultura de baixo impacto ambiental, e diminuição dos custos de produção (MOREIRA et al., 2010).

Por isso, pode-se dizer que nos últimos anos menos trabalhos foram realizados para investigar a inoculação de *Azospirillum* em condições de campo, possivelmente pela grande variação nos resultados. Por outro lado, houve o aumento na descoberta de novas espécies de bactérias promotoras de crescimento, como *G. diazotrophicus*, *H. seropedicae*, entre outras, uma vez que estas são consideradas endofíticas obrigatórias e podem habitar o tecido das plantas sem causar doenças (REIS, 2007).

O uso de inoculantes a base de bactérias tem se intensificado e os resultados têm sido significativos. Silva et al. (2009) utilizaram uma mistura de cinco bactérias para constituir um polímero e testar seus efeitos em cana-de-açúcar. Foram utilizadas as espécies *G. diazotrophicus*, *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *A. amazonense* e *B. tropica*. A resposta foi um aumento na produtividade similar à produção com adubação de nitrogênio, o que demonstra que pode haver economia na utilização de nitrogênio na cultura.

Para explorar todo o potencial das estirpes bacterianas promotoras de crescimento, é importante isolar bactérias nativas que estão bem adaptadas às

condições ambientais para utilizá-los como estirpes inoculantes (SOARES et al., 2006). O uso de bactérias diazotróficas endofíticas como inoculantes representa um grande potencial para reduzir a dependência de fertilizantes nitrogenados sintéticos (CONCEIÇÃO et al., 2009).

2.3 SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO

O fósforo é um dos macronutrientes essencialmente necessário para o rendimento máximo das culturas e ocorre naturalmente na biosfera na forma de fosfato (ISLAM et al., 2007). O fosfato desempenha papel muito importante na composição das células vegetais, como ácidos nucleicos, proteínas, lipídios e açúcares, além de estar diretamente envolvido nas reações de ATP (TAIZ; ZIEGER, 2009).

A maior parte do fosfato está incrustada em rochas, onde forma complexos com óxidos de cálcio, ferro, magnésio ou alumínio. O desgaste natural de rochas solubiliza fosfato muito lentamente pelo processo de intemperização. Muitas plantas e microrganismos associados exsudam ácidos inorgânicos que aceleram esse processo (EPSTEIN; BLOOM, 2006). A estabilidade dos compostos orgânicos depende de sua natureza e de sua interação com os minerais formadores, pois são utilizados como fonte de carbono e elétrons pelos microrganismos, resultando em mineralização e disponibilização do fósforo (SANTOS; GATIBONI; KAMINSKI, 2008). A assimilação de fosfato a partir compostos orgânicos pelas plantas e microrganismos ocorre através de um grupo de enzimas conhecidas como fosfatases que estão presentes em uma grande variedade de microrganismos de solo (SHARMA; KUMAR; TRIPATHI, 2011). As fosfatases agem catalisando a hidrólise de compostos fosfatados orgânicos com a produção de fósforo solúvel (NAHAS, 2002).

Devido à grande necessidade de fosfato para as plantas, crescentes quantidades de fertilizantes fosfatados são colocadas no ambiente provocando grande impacto ambiental, seja pela lixiviação no solo ou à alta demanda energética para a produção dos fertilizantes (PEDRINHO, 2009). Os fertilizantes fosfatados podem aumentar a disponibilidade de fosfato inicialmente, mas irão promover a formação de compostos insolúveis deixando o fósforo indisponível para as plantas (ONYIA; ANYANWU, 2013). Em solos ácidos pode haver indisponibilidade de fósforo

devido à sua fixação com Al e Fe (PANHWAR et al., 2011). Já em solos com pH próximos à neutralidade ou ligeiramente alcalinos, uma parte do P pode estar ligada ao cálcio formando compostos que são suscetíveis à solubilização por microrganismos (SOUCHIE; ABBOUD; CAPRONI, 2007).

Muitos microrganismos do solo são capazes de solubilizar formas indisponíveis de cálcio ligados ao fosfato através de suas atividades metabólicas, excretando ácidos orgânicos que irão dissolver as rochas fosfatadas diretamente ou irão quelar os íons cálcio e liberar o fósforo na solução (NAUTIYAL et al., 2000).

Muitos estudos têm sido conduzidos ao longo dos anos para compreender o papel dos microrganismos solubilizadores de fosfato na natureza. Além disso, devido ao insuficiente entendimento das bactérias envolvidas nesses processos, os mecanismos de metabolismo do fósforo ainda não são totalmente compreendidos (CHAUDHRY; NAUTIYAL, 2011).

Muitos solos são deficientes em formas prontamente disponíveis de fósforo para absorção pelas plantas, por conseguinte, a fim de contornar a deficiência de fósforo, microrganismos solubilizadores de fosfato poderiam desempenhar um papel importante no fornecimento de fosfato para plantas de forma ecológica e sustentável (ONYIA; ANYANWU, 2013)

Alguns microrganismos utilizados com outros propósitos, como o *Trichoderma* sp. que é bem conhecido no controle biológico de diversos fitopatógenos, foi estudado por sua capacidade de solubilizar fosfatos. A inoculação de *Trichoderma* sp. aumentou os parâmetros de crescimento de grão-de-bico sendo eles, o comprimento, peso seco e fresco de raiz e parte aérea, em solos com deficiência de fósforo solúvel (KAPRI; TEWARI, 2010). Assim como plantas inoculadas com cepas bacterianas obtidas de nódulos de feijão-caupi que apresentaram eficiência na solubilização de fosfato, obtiveram aumento tanto da massa seca da parte aérea quanto da massa seca dos nódulos (MARRA et al., 2012).

2.4 PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOLACÉTICO (AIA)

Os fitohormônios são substâncias que influenciam o crescimento e o desenvolvimento das plantas em baixas concentrações. Os principais hormônios vegetais são as auxinas, citocininas, giberelinas, etileno e ácido abscísico. A auxina

é considerada como o hormônio do crescimento, pois é responsável pelo alongamento e divisão celular, formação de raízes laterais, crescimento de frutos e ainda está envolvida com a formação de etileno (TAIZ; ZIEGER, 2009).

O ácido indolacético (AIA) é a auxina mais abundante e de grande relevância fisiológica nas plantas. A biossíntese de AIA está associada aos tecidos com rápida divisão celular e crescimento, especialmente em partes aéreas. Embora quase todos os tecidos vegetais sejam capazes de produzir baixos níveis de AIA, os meristemas apicais, as folhas jovens, os frutos e as sementes em desenvolvimento são os principais locais de síntese desse hormônio (KERBAUY, 2008).

Alguns microrganismos são capazes de produzir auxina, como as bactérias endofíticas que habitam os tecidos das plantas. Na interação planta-bactéria, o balanço hormonal da planta pode sofrer interferência na distribuição da auxina (SPAEPEN; VANDERLEYDEN, 2011).

A produção de AIA não funciona como um hormônio em células bacterianas que pode ter evoluído devido a sua importância na relação bactéria-planta. Este regulador, quando secretado por bactérias, pode promover o crescimento da raiz diretamente pela estimulação do alongamento das células e divisão celular, ou, indiretamente, pela influência sobre a atividade da ACC deaminase (1-aminociclopropano-1-carboxilato, um precursor do etileno) (PATTEN; GLICK, 2002).

Por outro lado, grande quantidade de AIA pode ter efeitos deletérios para a planta. O processo é explicado pelo fato do AIA bacteriano ser incorporado pela planta estimulado pela atividade da enzima ACC sintase, que resulta no aumento de ACC, e conseqüentemente, aumenta o etileno inibindo o alongamento das raízes. Mas geralmente, a auxina aumenta o comprimento e superfície da raiz, pois o AIA bacteriano afrouxa as paredes celulares das plantas, aumentando a quantidade de exsudação que proporciona nutrientes adicionais para suportar o crescimento de bactérias na rizosfera (GLICK, 2012). O equilíbrio entre AIA e o etileno podem ter importância fundamental na manutenção da bactéria dentro da planta (HARDOIM; OVERBEEK; ELSAS, 2008).

Diversos trabalhos atestam a produção de AIA pelas bactérias como auxiliares na promoção do crescimento de plantas. Ribeiro e Cardoso (2012) conduziram o isolamento de bactérias em raízes de araucária e estas produziram altos níveis de AIA. Quando testadas na presença de triptofano, a produção foi ainda maior. O triptofano é um aminoácido precursor do AIA que modela sua síntese

(AHEMAD; KIBRET, 2014). Apesar de haver outras rotas conhecidas para a produção de AIA, a rota do triptofano é a principal, desta maneira, a adição de triptofano ao meio de cultura resulta em aumento na produção de AIA (SPAEPEN; VANDERLEYDEN, 2011).

A produção de AIA é a característica de promoção de crescimento mais comum entre os isolados bacterianos, porém a quantidade deste hormônio é muito variável (ARRUDA et al., 2013). Estima-se que 80% de todos os isolados da rizosfera do solo são capazes de produzir substâncias regulatórias de crescimento como metabólitos secundários (PATTEN; GLICK, 1996).

2.5 DIVERSIDADE FENOTÍPICA DE BACTÉRAS ENDOFÍTICAS

A caracterização bacteriana feita por métodos convencionais é baseada em características fenotípicas, já que sua realização e o custo são mais acessíveis e pode ser empregada em qualquer laboratório (AREVALO, 2010). Individualmente, essas características não apresentam grande importância na identificação das bactérias, porém em conjunto são ferramentas importantes para o reconhecimento de alguns gêneros e espécies (VIDEIRA; ARAÚJO; BALDANI, 2007).

As formas tradicionais de caracterização fenotípica, realizada por meio da caracterização morfofisiológica se baseiam nas características observáveis das colônias, como sua morfologia, desenvolvimento e propriedades bioquímicas e metabólicas em meio de cultivo (HUNGRIA; SILVA, 2011).

A morfologia avalia as características celulares e da colônia. As bactérias são cultivadas em diferentes meios. Os meios apresentam características específicas para um determinado gênero ou espécie, o que facilita a identificação, pois algumas espécies de bactérias apresentam características peculiares quando cultivadas sob determinadas condições. As principais características da colônia avaliadas são: tempo para o aparecimento, coloração, consistência, diâmetro, produção de goma, elevação, forma, borda, superfície e detalhe óptico (VIDEIRA; ARAÚJO; BALDANI, 2007). A caracterização celular é feita por exame microscópico onde são avaliados seu tipo morfológico (bastonetes, espirilos, cocos) e seu arranjo isolado ou agrupado. Os bastonetes muito curtos são chamados cocobacilos (NOGUEIRA; MIGUEL, 2010).

As características fisiológicas e bioquímicas se baseiam nas informações da composição da parede celular das células, temperatura ideal, valores de pH, composição dos meios de cultivo, concentração de sal e açúcares, crescimento na presença de vários substratos, atividades enzimáticas, metabolização de compostos variados (VIDEIRA; ARAÚJO; BALDANI, 2007).

A coloração é a principal técnica para identificar a formação da parede celular de bactérias, distinguindo-as em gram positiva ou negativa de acordo com a cor das pigmentações realizadas. Outros testes bioquímicos tradicionais para a classificação de bactérias é o teste de oxidase, catalase e gelatinase (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

O pH e a temperatura ideal são fatores extremamente importantes para o crescimento das bactérias. Para a maioria das bactérias há um aumento no crescimento entre o pH mínimo e o ótimo e um decréscimo entre o pH ótimo e o máximo, determinando o efeito geral da mudança nas taxas da reação enzimática. Quanto à temperatura, as bactérias endofíticas são mesófilas, já que crescem em temperaturas medianas (VIDEIRA; ARAÚJO; BALDANI, 2007).

O meio de cultura semisseletivo é uma outra ferramenta fundamental na caracterização das bactérias endofíticas. Os meios são preparados de acordo com as exigências físicas e nutritivas dos microrganismos como a fonte de carbono ou outros compostos (NOGUEIRA; MIGUEL, 2010) e para o isolamento de diazotróficos são livres de N. Muitos estudos utilizam os meios semi-sólidos para o isolamento de diazotróficos devido a sua característica microaerofílica (MARIN et al., 1999). E apesar de todos os avanços nas técnicas moleculares usados para detectar bactérias, na maioria dos casos, o isolamento e identificação inicial são feitos em meios semissólidos (BALDANI et al., 2014). Como no caso do isolamento das espécies de *Azospirillum*, o qual se deve à introdução dos meios semissólidos livres de N (MARIN et al., 1999).

Os diferentes meios semi-específicos são um indicativo do gênero bacteriano, pois são compostos de acordo com as necessidades fisiológicas destes. Porém é possível o isolamento de bactérias que utilizam o mesmo tipo de fonte de carbono ou que sejam tolerantes ao mesmo nível de pH, como as espécies fixadoras de nitrogênio pertencentes aos gêneros *Stenotrophomonas*, *Pantoea*, *Enterobacter* que são isoladas da cana-de-açúcar usando os meios LGI, LGI-P e JNFb (BALDANI et al., 2014).

Os meios são utilizados na busca por determinadas atividades e mesmo os que são livres de nitrogênio favorecem a obtenção de diazotróficos, mas não a garantem (SILVEIRA; GRANADA, 2014). O meio LG tem como fonte de carbono a sacarose e tem por objetivo o isolamento de *Azotobacter* spp. e *Azomonas* spp em pH 7,0 (DÖBEREINER et al., 1995). O meio LGI foi desenvolvido a partir do LG, portanto utiliza a mesma fonte de carbono e o pH é ajustado para 6,0 para o isolamento de *A. amazonense*. JNFb, NFb e DYGS têm como fonte de carbono o ácido málico. JNFb foi desenvolvido para o isolamento de *Herbaspirillum* spp. e *Sphingomonas* spp. em pH 5,8, enquanto NFb isola *Azospirillum* spp. em pH 6,8. O meio DYGS em pH 6,0 tem por objetivo isolar *Herbaspirillum* spp. e *Gluconacetobacter* spp. (BALDANI et al., 2014).

Devido a grande diversidade fenotípica dos microrganismos encontrados, percebe-se à alta dissimilaridade em relação às espécies já descritas, sugerindo novas espécies (MOREIRA et al., 2010). Os meios de cultura são um indicativo do gênero ou espécie que se pretende isolar, que aliado às características morfológicas, fisiológicas e genéticas, possibilita que as novas espécies sejam descritas.

2.6 MICRORGANISMOS ASSOCIADOS ÀS RAÍZES DE QUINOA

Desde a década de 1970, no Brasil, diversos estudos têm sido conduzidos para demonstrar a associação entre bactérias e plantas não leguminosas. Inicialmente, a investigação era feita na busca de bactérias fixadoras de nitrogênio (BALDANI; BALDANI, 2005) e mais tarde percebeu-se que os efeitos da associação extrapolavam esta característica.

Já foi comprovada a ocorrência de bactérias endofíticas em diversas culturas. Os principais estudos são focados no milho, trigo, cana-de-açúcar, arroz, a exemplo do endofítico *Herbaspirillum seropedicae* que foi isolado de plantas de milho, sorgo e arroz (BALDANI et al., 1986) e *Gluconacetobacter diazotrophicus*, isolado de plantas de cana-de-açúcar (CAVALCANTE; DÖBEREINER, 1988)

Azevedo (1998) assume que possivelmente todas as plantas possuam microrganismos endofíticos, todavia, existe certa especificidade endófito-hospedeiro. Algumas espécies bacterianas são comumente encontradas no interior de diversas plantas, enquanto outras são mais específicas ao hospedeiro. Isso nos permite

inferir que plantas que ainda não foram estudadas como a quinoa, pode apresentar o isolamento de microrganismos que ainda não foram descritos.

O isolamento de bactérias endofíticas associadas às raízes de quinoa pode contribuir para a formulação de novos inoculantes para a cultura, melhorando o sistema no qual pode ser aproveitada e facilitando sua adaptação nas condições brasileiras de cultivo.

3 REFERÊNCIAS

- AHEMAD, M.; KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant promoting rhizobacteria: current perspective. **Journal of King Saud University – Science**, v. 26, p. 1-20, 2014.
- AREVALO, G. B. **Métodos de identificación bacteriana em el laboratorio de microbiología**. Espanha: Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 2010. 52 p.
- ARRUDA, L. et al. Screening of rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) in Rio Grande do Sul State (South Brazil) and analysis of their potential to improve plant growth. **Applied Soil Ecology**, v. 63, p. 15-22, 2013.
- ASSUMPÇÃO, L. C. et al. Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p. 503-510, 2009.
- AZEVEDO, J. L. Microorganismos endofíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (eds.). *Ecologia Microbiana*. Jaguariúna-SP: Editora EMBRAPA, 1998, p. 117-137.
- BALDANI, J. I. et al. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, p. 86-93, 1986.
- BALDANI, J. I. et al. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology Biochemistry**, v. 29, p. 911-922, 1997.
- BALDANI, J. I. et al. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. **Plant and soil**, v.384, p.413-431, 2014.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L.D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 77, p. 549-579, 2005.
- BERGAMASCHI, C. et al. Ocorrência de bactérias diazotróficas associadas a cultivares de sorgo forrageiro. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 727-733, 2007.
- BORGES, J. T. et al. Características físico-químicas, nutricionais e formas de consumo da quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). **Temas Agrários**, v. 15, n. 1, p. 9-23, 2010.
- CARRASCO, E.; SOTO, J. L. Importancia de los granos andinos. In: ROJAS, W. et al. (eds.). **Granos Andinos: avances, logros y experiencias desarrolladas en quinua, cañahua y amaranto en Bolivia**. Roma-Italia: Biodiversity International, 2010. p. 6-10.
- CASAS, R. M. **Adubação orgânica em condições de irrigação suplementar e seu efeito na produtividade de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) no planalto**

da Bolívia. 2012. 98 f. Tese (Doutorado em Processos Físicos e Morfogenéticos do Solo) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

CAVALCANTE, V. A.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, v. 108, p. 23-31, 1988.

CHAUDHRY, V.; NAUTIYAL, C. S. A high throughput method and culture medium for rapid screening of phosphate accumulating microorganisms. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 8057-8062, 2011.

CONCEIÇÃO, P. M. et al. Efeito dos ácidos húmicos na inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em sementes de milho. **Ciência Rural**, v. 39, p. 1880-1883, 2009.

DÖBEREINER, J. et al. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1995, 60 p.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A.J. **Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas**. Londrina-PR: Editora Planta, 2006, 402 p.

FARINA, R. et al. Diversity of plant growth-promoting rhizobacteria communities associated with the stages of canola growth. **Applied Soil Ecology**, v. 55, p. 44-52, 2012.

FERREIRA, E. P. B.; KNUPP, A. M.; MARTIN-DIDONET, C. C. G. Crescimento de cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) influenciado pela inoculação com bactérias promotoras de crescimento de plantas. **Bioscience Journal**, v.30, p. 655-665, 2014.

GARDNER, J. M.; FELDMAN, A. W.; ZABLOTOWICZ, R. M. Identify and behavior of xylem-residing bacteria in rough lemon roots of Florida citrus trees. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, p. 1335-1342, 1982.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, p. 1-15, 2012.

GLICK, B. R.; PENROSE, D. M.; LI, J. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. **Journal of Theoretical Biology**, v. 190, p. 63-68, 1998.

HARDOIM, P. R.; OVERBEEK, L. S.; ELSAS, J. D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, v. 10, p. 463-471, 2008.

HUNGRIA, M.; SILVA, K. **Manual de curadores de germoplasma-micro-organismos: rizóbios e bactérias promotoras do crescimento vegetal**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2011. 21p.

IKEDA, A. C et al. Morphological and genetic characterization of endophytic bacteria isolated from roots of different maize genotypes. **Microbial Ecology**, v. 65, p. 154-160, 2012.

ISHIMOTO, E. Y.; MONTEIRO, M. P. Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) as functional food. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 8, p. 62-67, 2010.

ISLAM, M. R. et al. Characterization of plant growth-promoting traits of free-living diazotrophic bacteria and their inoculation effects on growth and nitrogen uptake of crop plants. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p. 1213-1222, 2009.

ISLAM, T. et al. Isolation and identification of potential phosphate solubilizing bacteria from rhizoplane of *Oryza sativa* L. cv. BR29 of Bangladesh. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 62, p. 103-110, 2007.

JACOBSEN, S.-E.; MUJICA, A.; ORTIZ, R. La importancia de los cultivos andinos. **Fementum**, v. 13, p. 14-24, 2003.

JI, S. H.; GURURANI, M. A.; CHUN, S. C. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. **Microbiological Research**, v. 169, p. 83-98, 2014.

KAPRI, A.; TEWARI, L. Phosphate solubilization potential and phosphatase activity of rhizospheric *Trichoderma* spp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 787-795, 2010.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, 431 p.

KRIVONOS, E. Quinoa. In: **Food Outlook: Biannual report on global food markets**. FAO, 2013. p. 59-65.

LODEWYCKX, C. et al. Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 21, p. 583-606, 2002.

MARIN et al. **Fixação Biológica de Nitrogênio: Bactérias Fixadoras de Nitrogênio de Importância para a Agricultura Tropical**, Embrapa Agrobiologia, 1999, 24 p.

MARRA, L. M. et al. S. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. **Plant Soil**, v. 357, p. 289-307, 2012.

MOREIRA, F. M. S. et al. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v. 1, p. 74-99, 2010.

MUJICA, A.; JACOBSEN, S.-E. La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) y sus parientes silvestres. In: Moraes, M. et al. (eds.). **Botánica Económica de los Andes Centrales**, La Paz-Bolivia: Universidad Mayor de San Andrés, 2006. p. 449-457.

NAHAS, E. Microrganismos do solo produtores de fosfatases em diferentes sistemas agrícolas. **Bragantia**, v. 61, p. 267-275, 2002.

NAUTIYAL, C. S. et al. Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. **FEMS Microbiology Letters**, v. 182, p. 291-296, 2000.

NOGUEIRA, J. M. R.; MIGUEL, L. F. S. Bacteriologia. In: MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. **Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV, 2010. p. 221-397.

ONYIA, C. E.; ANYANWU, C. U. Comparative study on solubilization of tri-calcium phosphate (TCP) by phosphate solubilizing fungi (PSF) isolated from Nsukka pepper plant rhizosphere and root free soil. **Journal of Yeast and Fungal Research**, v. 4, p. 52-57, 2013.

PANHWAR, Q. A. et al. Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from aerobic rice. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 2711-2719, 2012.

PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 207-220, 1996.

PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 3795-3801, 2002.

PEDRINHO, E. A. N. **Isolamento e caracterização de bactérias promotoras de crescimento em milho (*Zea mays* L.)**. 2009, 87p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal-SP, 2009.

PEDRINHO, E. A. N. et al. Identificação e avaliação de rizobactérias isoladas de raízes de milho. **Bragantia**, v. 69, p. 905-911, 2010.

PERALTA, E. et al. **Manual agrícola de granos andinos: chocho, quinua, amaranto y ataco**. Quito-Ecuador: INIAP, 2012. 68 p.

REIS, V. M. **Uso de bactérias fixadoras de nitrogênio como inoculante para aplicação em gramíneas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007, 22p.

REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R. S. Fixação biológica do nitrogênio – Estado da arte. In: AQUINO, A. M. de; ASSIS, R. L. (eds.) **Processos biológicos no sistema solo-planta: ferramentas para uma agricultura sustentável**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005.

REPO-CARRASCO-V R. et al. Cultivos andinos. In: LEÓN, A. E.; ROSELL, C. M. (eds.) **De tales harinas, tales panes: granos harinas y productos de panificación en Iberoamérica**. Córdoba-Argentina: Hugo Báez Editor, 2007. p. 243-294.

RIBEIRO, C. M.; CARDOSO, E. J. B. N. Isolation, selection and characterization of root-associated growth promoting bacteria in Brasil pine (*Araucaria angustifolia*). **Microbiological Research**, v. 167, p. 69-78, 2012.

RODRIGUES, E. P. et al. **Obtenção e seleção de mutantes Tn5 de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Pal 5) com alterações na produção de auxinas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007. 20 p.

ROESCH, L. F. W. et al. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a plantas de milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, n. 1, p. 1367-1380, 2007.

SALA, V. M. R.; FREITAS, S. S.; SILVEIRA, A. P. D. Interação entre fungos micorrízicos arbusculares e bactérias diazotróficas em trigo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 11, p. 1593-1600, 2007.

SANTOS, D. R.; GATIBONI, L. C.; KAMINSKI, J. Fatores que afetam a disponibilidade do fósforo e o manejo da adubação fosfatada em solos sob sistema plantio direto. **Ciência Rural**, v. 38, p. 576-586, 2008.

SHARMA, S.; KUMAR, V.; TRIPATHI, R. B. Isolation of phosphate solubilizing microorganism (PSMs) from soil. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v. 2, p. 90-95, 2011.

SILVA, D. M. et al. Bactérias diazotróficas em solo cultivado com arroz irrigado (*Oryza sativa* L.). **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 10, n. 4, p. 467-474, 2004.

SILVA, M. F. et al. Inoculantes formulados com polímeros e bactérias endofíticas para a cultura da cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p. 1437-1443, 2009.

SILVEIRA, A. A.; GRANADA, C. E. Isolamento e caracterização de bactérias promotoras de crescimento vegetal. In: SPEROTTO, R. A. **Protocolos e métodos de análise de laboratórios de biotecnologia agroalimentar e de saúde humana**. Lajeado: Univates, 2014. 329p.

SOARES, R. A. et al. Occurrence and distribution of nitrogen fixing bacterial community associated with oat (*Avena sativa*) assessed by molecular and microbiological techniques. **Applied Soil Ecology**, v. 33, p. 221-234, 2006.

SOUCHIE, E. L.; ABOUD, A. C. S.; CAPRONI, A. L. Solubilização de fosfato *in vitro* por microrganismos rizosféricos de guandu. **Bioscience Journal**, v. 23, p. 53-60, 2007.

SOUZA, M. L. Utilização de microrganismos na agricultura. **Biociência e Desenvolvimento**, v. 4, p. 28-31, 2001.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. Auxin and plant-microbe interactions. **Cold Spring Harb Perspectives in Biology**, v. 2, p. 1-14, 2011.

SPEHAR, C. R. Adaptação da quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) para incrementar a diversidade agrícola e alimentar no Brasil. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, v. 23, p. 41-62, 2006.

SPEHAR, C. R.; ROCHA, J. E. S.; SANTOS, L. B. Desempenho agrônomo e recomendações para cultivo de quinoa (BRS Syetetuba) no cerrado. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 41, p. 145-147, 2011.

SPEHAR, C. R.; SANTOS, R. L. B. Quinoa BRS Piabiru: alternativa para diversificar os sistemas de produção de grãos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, p. 889-893, 2002.

TAIZ, L.; ZIEGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009, 819 p.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2012, 934 p.

VIDEIRA, S. H.; ARAÚJO, J. L. S.; BALDANI, V. L. D. **Metodologia para isolamento e posicionamento taxonômico de bactérias diazotróficas oriundas de plantas não-leguminosas**. Rio de Janeiro: Embrapa, 2007, 74 p.

YIM, W. J. et al. Characterization of plant-growth promoting diazotrophic bacteria isolated from field-grown Chinese cabbage under different fertilization conditions. **Journal Microbiology**, v. 47, p. 147-155, 2009.

CAPÍTULO II - ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS NA CULTURA DA QUINOA

RESUMO

A quinoa possui inúmeras qualidades nutricionais importantes. Diversos estudos têm sido conduzidos com o propósito de adaptá-la ao Brasil, porém nenhum demonstra sua associação com bactérias do meio. Este trabalho foi desenvolvido com objetivo de isolar e caracterizar fenotipicamente bactérias endofíticas e quantificar bactérias diazotróficas associadas a raízes de quinoa, quando cultivada em solos da região oeste do Paraná. Raízes de plantas isca de quinoa foram maceradas e inoculadas em meios sólidos e semissólidos com ausência de nitrogênio. Foi quantificado o Número Mais Provável (NMP) de bactérias diazotróficas e avaliadas as características das colônias: tamanho, alteração do pH nos meios de cultura do isolamento, cor, forma, elevação, borda, superfície, densidade e consistência, assim como as características morfológicas da bactéria e coloração de Gram. Foram obtidas 130 colônias de bactérias endofíticas, destas, sete a partir dos meios semissólidos. A densidade da população bacteriana pela técnica do Número Mais Provável variou de não detectado a $1,5 \times 10^5$ células g^{-1} de raiz. Todos os isolados caracterizados fenotipicamente foram distribuídos em uma matriz de distância euclidiana. Os resultados obtidos foram dispostos graficamente em um dendograma, onde foi possível observar a grande diversidade morfológica com a formação de 14 grupos a 70% da dissimilaridade obtida.

Palavras-chave: *Chenopodium quinoa*, dendograma, NMP, diversidade bacteriana

Isolation and phenotypic characterization of endophytic bacteria in quinoa

ABSTRACT

Quinoa has many important nutritional qualities. Many studies have been conducted in order to adapt it to Brazil, but no one shows the association between bacteria and the environment. We aimed to isolate and characterize phenotypically endophytic bacteria and quantify diazotrophs associated with quinoa roots, when they have grown in soils of western region of Paraná. Quinoa roots bait-plants were macerated and inoculated into N-free semi-solids and solid media. It was countered the Most Probable Number (MPN) of diazotrophs bacteria and evaluated the colonies traits: size, pH alteration in the culture media isolation, color, shape, elevation, margin, surface, density and consistency, the same way the morphological traits bacteria and Gram staining. A total of 130 colonies of endophytic bacteria were obtained, these, seven from the semi-solid media. The density of the bacterial population by the Most Probable Number technique ranged from not detected to $1,5 \times 10^5$ cells per g^{-1} root. All isolates phenotypically characterized were distributed in a Euclidean distance matrix. The results were arranged graphically in a dendogram, where it was possible observe the great morphological diversity and the formation of 14 groups to 70% of obtained dissimilarity.

Keywords: *Chenopodium quinoa*, dendograma, MPN, bacterial diversity.

1 INTRODUÇÃO

A quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) é um alimento com características nutricionais excepcionais (MIRANDA et al., 2010), tendo como centro de diversidade a região andina. Apresenta, ainda, grande capacidade de adaptação a diferentes condições edafoclimáticas. No Brasil, foi introduzida na região do cerrado na década de 1990 e desde então, há programas de melhoramento explorando a grande diversidade genética da quinoa. Os resultados são promissores (SPEHAR; ROCHA; SANTOS, 2011) e tem sido considerada como uma opção aos agricultores nas entressafras do milho ou soja, tanto para a produção de grãos como para forragem (SPEHAR, 2006).

A quinoa pode ser cultivada em diversos tipos de solo, desde argilosos até arenosos com boa drenagem e pH entre 5,5 e 8,0 (PERALTA et al., 2012). O sistema radicular é pivotante, extremamente ramificado e dá origem a algumas raízes muito longas e tênues (MUJICA; JACOBSEN, 2006). As raízes de inúmeras plantas interagem com bactérias endofíticas que se associam de forma mutualística (MOREIRA et al., 2010). Muitas pesquisas demonstram que a presença de bactérias endofíticas está relacionada à promoção de crescimento em plantas de diversas culturas, como sorgo (BERGAMASCHI et al., 2007); arroz (RODRIGUES et al., 2006); trigo (BENEDUZI et al., 2008); milho (PEDRINHO et al., 2010; ROESCH et al., 2007); cana-de-açúcar (ANTONIO; REIS, 2011). Contudo, a relação entre quinoa e microrganismos endofíticos requer pesquisa.

A promoção de crescimento está relacionada à produção de fitohormônios, principalmente o ácido indolacético (AIA), síntese de sideróforos e solubilização de fósforo. Estas bactérias ainda podem atuar como supressoras de algumas doenças por meio de antagonismo. As bactérias fixadoras de nitrogênio ou diazotróficas são também consideradas como promotoras de crescimento, uma vez que transformam o nitrogênio atmosférico em amônia, tornando-o disponível para as plantas (LODEWYCKX et al., 2002).

São utilizados diversos métodos para o isolamento desses microrganismos, como o uso de meios de cultura semi-seletivos e avaliação das propriedades fisiológicas de promoção de crescimento (SILVEIRA; GRANADA, 2014). Para a identificação dos isolados, a primeira etapa consiste em avaliar suas informações fenotípicas (VIDEIRA; ARAÚJO; BALDANI, 2007). A morfologia das colônias, assim

como da célula, é indispensável para a caracterização preliminar e posteriormente, a identificação desses microrganismos. A taxonomia bacteriana incorporou novos métodos de identificação nas últimas décadas, porém a análise fenotípica continua sendo uma importante ferramenta para a obtenção de informações iniciais para a descrição de bactérias (MADIGAN; BROCK; PARKER, 2010).

O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar fenotipicamente bactérias endofíticas e quantificar bactérias diazotróficas associadas a raízes de quinoa cultivada em solos da região oeste do Paraná.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A semeadura da quinoa ocorreu no período de outubro a dezembro de 2014 em quatro áreas: (1) solo de floresta e (2) solo agricultável da Fazenda Experimental de Entre Rios do Oeste/PR (Figura 1), pertencentes à UNIOESTE; (3) solo de floresta e (4) solo agricultável da Fazenda Experimental da PUCPR *Campus* de Toledo/PR (Figura 2). Os solos das quatro áreas são classificados como LATOSSOLO VERMELHO Distroféricos (EMBRAPA, 2006).



Figura 1. Locais de coleta das raízes de plantas isca de quinoa em Entre Rios do Oeste/PR



Figura 2. Locais de coleta de raízes de plantas isca de quinoa em Toledo/PR

Além disso, foi realizada a análise físico-química dos solos utilizados para a semeadura conforme demonstrado na Tabela 1. As sementes utilizadas foram do genótipo Q12 23 oriundas do programa de Melhoramento de Quinoa da UNIOESTE.

Tabela 1. Análise físico-química da camada 0-20 cm dos solos utilizados no cultivo da quinoa nos municípios de Entre Rios do Oeste e Toledo, estado do Paraná, em setembro de 2014.

Solo	pH	P mg dm ⁻³	MO g dm ⁻³	H ⁺ Al	Al ³⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	SB	CTC	V	Al
											-----cmol _c d ⁻³ -----	
											%	
FER ¹	5,03	3,91	31,44	5,54	0,10	0,44	4,64	1,60	6,68	12,22	54,66	1,47
AER	4,63	29,72	23,24	5,42	0,20	0,85	4,04	0,99	5,88	11,30	52,04	3,29
FTO	4,18	11,57	42,38	9,47	0,70	0,21	2,30	1,03	3,54	13,01	27,21	16,51
ATO	4,32	16,43	27,34	7,86	0,65	0,84	1,72	0,91	3,47	11,33	30,63	15,78

¹- FER: solo de floresta de Entre Rios do Oeste; AER: solo agricultável de Entre Rios do Oeste; FTO: solo de floresta de Toledo; ATO: solo agricultável de Toledo.

Aos 40 dias após a emergência foi realizada a retirada das plantas de modo a manter o máximo de raízes. As mesmas foram levadas ao Laboratório de Biotecnologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) *Campus* Toledo, onde foram lavadas em água corrente até completa retirada do solo e em seguida, secas em papel toalha. Pesaram-se 1g de raiz para cada repetição, totalizando 3 repetições para cada área avaliada. Em câmara de fluxo laminar as raízes foram imersas em etanol 70% por 30 segundos. O etanol foi desprezado e adicionou-se hipoclorito de sódio 0,2% por 60 segundos, seguido por tríplice lavagem com água destilada e autoclavada.

O isolamento foi realizado segundo metodologia de Döbereiner et al. (1995), procedendo a maceração das raízes em almofariz com 1 mL de solução salina. O produto resultante foi vertido em tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina (0,85%) e a partir de cada amostra foi realizada a diluição seriada para cada repetição. Desta maneira, 0,1 mL das diluições 10⁻² a 10⁻⁷ foram espalhadas com alça de Drigalski em placas de Petri, as quais continham um dos seguintes meios sólidos: NFB, JNFB, LG, LGI (DÖBEREINER et al., 1995) ou DYGS (DÖBEREINER et al., 1999). As placas foram colocadas em estufa bacteriológica pelo período de 7 dias na temperatura de 30°C ±2°C, com exceção do LGI que foi incubado em temperatura de 35°C ±2°C. As colônias que cresceram nos meios foram

selecionadas e repicadas nos mesmos meios em que foram isoladas pelo método de estriamento em placas. A ação foi repetida até a obtenção de colônias puras.

Em frascos pequenos contendo 5 mL dos meios semissólidos NFb, JNFb, LG e LGI foi inoculado 0,1 mL das suspensões de diluição 10^{-3} a 10^{-5} em triplicata e incubados por 7 dias em estufa bacteriológica nas mesmas temperaturas indicadas para os meios sólidos. A formação de película na superfície indicou a presença de bactérias diazotróficas que foram repicadas em placas contendo meio sólido acrescido de 20 mg do extrato de levedura (DÖBEREINER et al., 1995).

Os isolados obtidos a partir dos meio sólidos e semissólidos foram conservados em frascos pequenos contendo 5 mL de seus respectivos meios de cultura sólido inclinado em duplicata.

A presença ou ausência da formação de película no meio semissólido foi utilizado ainda, como referência para quantificação do número de bactérias presentes na amostra. Desta forma, a densidade da população bacteriana foi obtida pela técnica do Número Mais Provável (NMP), utilizando a tabela de McCrady (DÖBEREINER et al., 1995), tendo como resultado o número de células g^{-1} de raiz de quinoa.

A análise fenotípica pode examinar as características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas da célula. As bactérias apresentam traços peculiares quando cultivadas sob determinadas condições, que são importantes no processo de caracterização. As características morfofisiológicas das colônias avaliadas foram: tamanho das colônias (em mm), alteração do pH nos respectivos meios de cultura, cor, forma, elevação, borda, superfície, densidade e consistência de acordo com o manual de Hungria e Silva (2011). A morfologia das colônias nos diferentes meios de cultura foram avaliadas aos 7 dias de crescimento com auxílio de uma lupa. Os isolados bacterianos foram caracterizados com relação à resposta na coloração de Gram, e ainda, em microscópio óptico foi avaliada a morfologia da bactéria quanto à forma celular.

Foram utilizadas as cepas de referência *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 e *Azospirillum brasilense* Ab-V5 para todas as caracterizações realizadas.

A partir dos dados resultantes das análises morfofisiológicas foi obtida a matriz de distâncias euclidiana com o coeficiente de dissimilaridade entre os isolados. Com esta matriz procedeu-se o agrupamento dos isolados por meio do método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), gerando um

dendograma. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do aplicativo computacional GENES (CRUZ, 2013).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O isolamento resultou em 130 colônias de bactérias endofíticas, distribuídas nas quatro áreas avaliadas. Destas, 32 foram isoladas do solo da área de floresta e 41 da área agricultável de Entre Rios do Oeste, 29 da floresta e 28 da área agricultável de Toledo.

As bactérias identificadas com o número de 1 a 41 foram isoladas das raízes das plantas de quinoa cultivadas na Área Agricultável de Entre Rios (AER), de 42 a 69 das plantas cultivadas na Área Agricultável de Toledo (ATO), de 70 a 98 de raízes das plantas de quinoa da Área de Floresta de Toledo (FTO) e 99 a 130 de plantas cultivadas na Área de Floresta de Entre Rios (FER), AZ-131 corresponde à cepa de referência *A. brasilense* e HB-132, *H. seropedicae*.

Das 130 bactérias isoladas, sete foram obtidas a partir dos meios semissólidos JNFb, LG e NFb, nas áreas agricultáveis de Entre Rios do Oeste e Toledo, sendo que não houve isolamento de bactérias em meios semissólidos nas áreas de floresta de ambos os locais. Os isolados da área agricultável de Entre Rios do Oeste foram identificados como AER-16, AER-17, AER-25 e AER-33 e os isolados da área agricultável de Toledo foram ATO-65, ATO-68 e ATO-69.

Segundo Videira, Araújo e Baldani (2007) bactérias diazotróficas endofíticas são isoladas em meios semissólidos e livres de nitrogênio (N), uma vez que a enzima nitrogenase, responsável pela degradação do N, é sensível ao oxigênio e estas se alojam logo abaixo da superfície do meio. As sete colônias de bactérias obtidas a partir dos meios semissólidos são provavelmente endofíticos fixadores de nitrogênio, pois além de terem sido isoladas em meios semissólidos, foram isolados dos tecidos radiculares das plantas de quinoa.

Pelas análises, evidencia-se que 27% dos isolados foram obtidos quando se empregou o meio DYGS, 21% em NFb, 18% em LG e JNFb e 17% em LGI. Assim, todos os meios foram eficientes no isolamento de bactérias associadas a plantas de quinoa. Os meios empregados diferem principalmente em relação à fonte de carbono e pH, objetivando isolar grande número de bactérias. A presença de endófitos em plantas de quinoa confirma a existência de associação planta-bactéria para esta cultura, da mesma forma que ocorre em diversas outras, como o arroz (RODRIGUES et al, 2006) e o milho (PEDRINHO et al., 2010; ROESCH et al., 2007).

Houve maior quantidade de bactérias isoladas em meio DYGS, possivelmente por ser um meio mais rico em nutrientes. Os meios de cultura, por serem seletivos para determinados gêneros podem ter limitado o isolamento de uma população ainda mais variada de bactérias (VIDEIRA et al., 2011). Por outro lado, o uso dos meios seletivos facilita a caracterização das bactérias isoladas.

As características morfofisiológicas foram muito variadas, resultado da abundante heterogeneidade das colônias de bactérias isoladas. Porém, cabe ressaltar que se sobressaíram as bactérias de forma circular, incolores, de borda inteira com elevação convexa, superfície fosca, opaca e de consistência viscosa. A grande parte dos isolados não alterou o pH do meio de cultura onde se encontravam, mantendo-o, neutro (Figura 3).

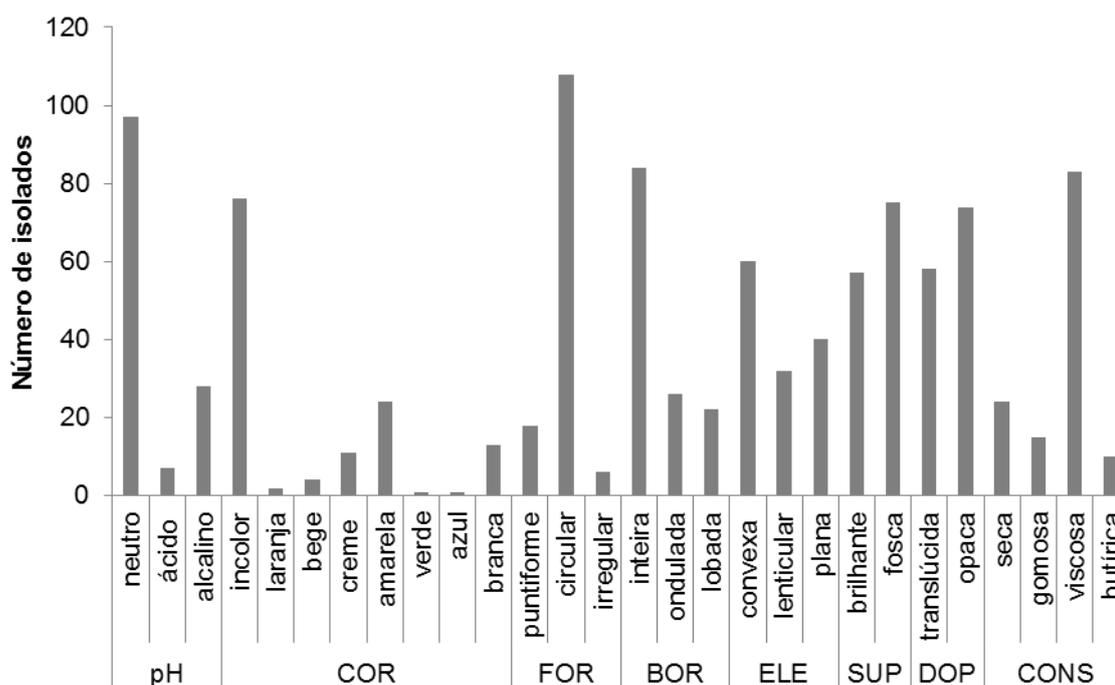


Figura 3. Características morfofisiológicas das colônias avaliadas em relação à alteração do pH no meio de cultura (pH), coloração (COR), forma (FOR), borda (BOR), elevação (ELE), superfície (SUP), detalhes ópticos (DOP) e consistência (CONS), referente aos isolados das áreas de Entre Rios do Oeste e Toledo, estado do Paraná, entre outubro e dezembro de 2014.

Já no que se refere às características estruturais da bactéria, 53% se tratava de bacilo Gram negativo, sendo que se analisando apenas Gram, 90% eram negativas. Estes dados são similares aos encontrados por Dall'Óglio-Chaves (2013) no isolamento de bactérias endofíticas em plantas isca de trigo e milho. Apesar de

haver bactérias endofíticas Gram positivas como *Paenibacillus* (BENEDUZI et al., 2008), a maioria das que possuem capacidade de promoção de crescimento como *Herbaspirillum*, *Azospirillum* e *Burkholderia* são Gram negativas.

As bactérias endofíticas podem ocorrer em qualquer tecido da planta. Em geral, o número de bactérias é maior na raiz em relação às demais partes, porém a contagem da população bacteriana diazotrófica pela técnica do NMP variou de não detectado a $1,5 \times 10^5$ células mL⁻¹ (Tabela 2) nas amostras de raízes de quinoa. Antonio e Reis (2011) observaram grande variação na contagem de células em isolados de cana-de-açúcar advindos de diferentes locais de coleta.

Tabela 2. Contagem de bactérias diazotróficas endofíticas pela técnica do Número Mais Provável (NMP) nas áreas de Entre Rios do Oeste e Toledo, estado do Paraná, entre outubro e dezembro de 2014

Meio de cultura	Solo da Área de			
	Floresta de Entre Rios do Oeste	Agricultável de Entre Rios do Oeste	Floresta de Toledo	Agricultável de Toledo
JNFb	ND*	$4,5 \times 10^4$	ND	$1,5 \times 10^5$
LG	ND	$2,5 \times 10^4$	ND	ND
NFb	ND	$2,5 \times 10^4$	ND	$4,5 \times 10^4$
LGI	ND	ND	ND	ND

*- ND: não detectado.

A população bacteriana pode variar em função de diferentes fatores, como a composição do solo, pH e a existência de culturas anteriores, evidenciado neste trabalho pela inexistência de bactérias diazotróficas endofíticas presentes nas amostras de raízes de quinoa que foram cultivadas nas áreas de floresta. Pela análise de solo (Tabela 1) pode-se perceber a existência de maior quantidade de matéria orgânica nas áreas de floresta, porém trata-se de solo inexplorado comercialmente. Nas áreas agricultáveis, culturas anteriores foram substituídas por quinoa o que pode ter acarretado a diferença na população de isolados. Rodrigues et al. (2006) atribuíram a diferença de comportamento das populações bacterianas à época de plantio e as condições experimentais do solo quando trabalhou com duas variedades de arroz em solos das regiões do Rio de Janeiro e Goiás.

O agrupamento das características fenotípicas gerou um dendograma, possibilitando identificar a formação de 14 grandes grupos quando a separação ocorreu em 70% de toda a dissimilaridade média obtida (Figura 4). A medida de

dissimilaridade quantifica a distância entre as respostas das características avaliadas nos isolados, esta por sua vez comprova a grande diversidade de microrganismos nas áreas, podendo ser observado a similaridade de organismos de áreas diferentes e também dos organismos pertencentes à mesma área.

Os maiores grupos foram o I com 29 isolados, seguido do grupo VIII composto por 23 isolados. Os menores grupos foram o IV e XIV formados por apenas AER-13 e FTO-96, respectivamente.

H. seropedicae (HB-132) se enquadrou no grupo IX e apresentou pequena distância morfológica para o isolado FER-114, enquanto *A. brasilense* (AZ-131) se apresentou no grupo VII e se demonstrou morfológicamente próximo de ATO-58 e FER-117. Pode-se perceber que o isolado ATO-65 (área Agricultável de Toledo) e o FTO-93 (área de Floresta de Toledo), assim como o AER-25 (área Agricultável de Entre Rios) e o FTO-92 (área de Floresta de Toledo) tiveram 100% de similaridade, demonstrando dessa forma que, bactérias endofíticas similares são encontradas, independentes do tipo de solo em que sobrevivem.

Alguns solos, no entanto, podem ser mais propícios a uma maior variedade de bactérias em função da composição, pH e outros fatores. Ikeda (2010) atribuiu a alta variabilidade genética pelo índice de matéria orgânica e alta CTC, o que não pôde ser confirmado neste trabalho, uma vez que o pH, assim como a percentagem de CTC podem não ser os únicos fatores de composição do solo que afetam a diversidade de endófitos.

Em geral, houve heterogeneidade entre os grupos, pois quase a totalidade destes apresentou bactérias advindas dos vários tipos de solo. O grupo I, no entanto, se destacou por apresentar 62% de sua composição por indivíduos isolados da Área Agricultável de Entre Rios e 21% dos isolados da Área Agricultável de Toledo, ou ainda 83% de isolados pertencentes à área agricultável.

Outro grande grupo que se deve ressaltar é o grupo VIII, por ter 73% de seus integrantes advindos de solo de floresta, tanto de Toledo quanto de Entre Rios. Da mesma forma, 72% do grupo IX foram constituídos por endofíticos da área de Floresta de Entre Rios do Oeste. Os solos de floresta são característicos pelo acúmulo de matéria orgânica, porém a composição de ambos é distinta, o que pode ter promovido este agrupamento.

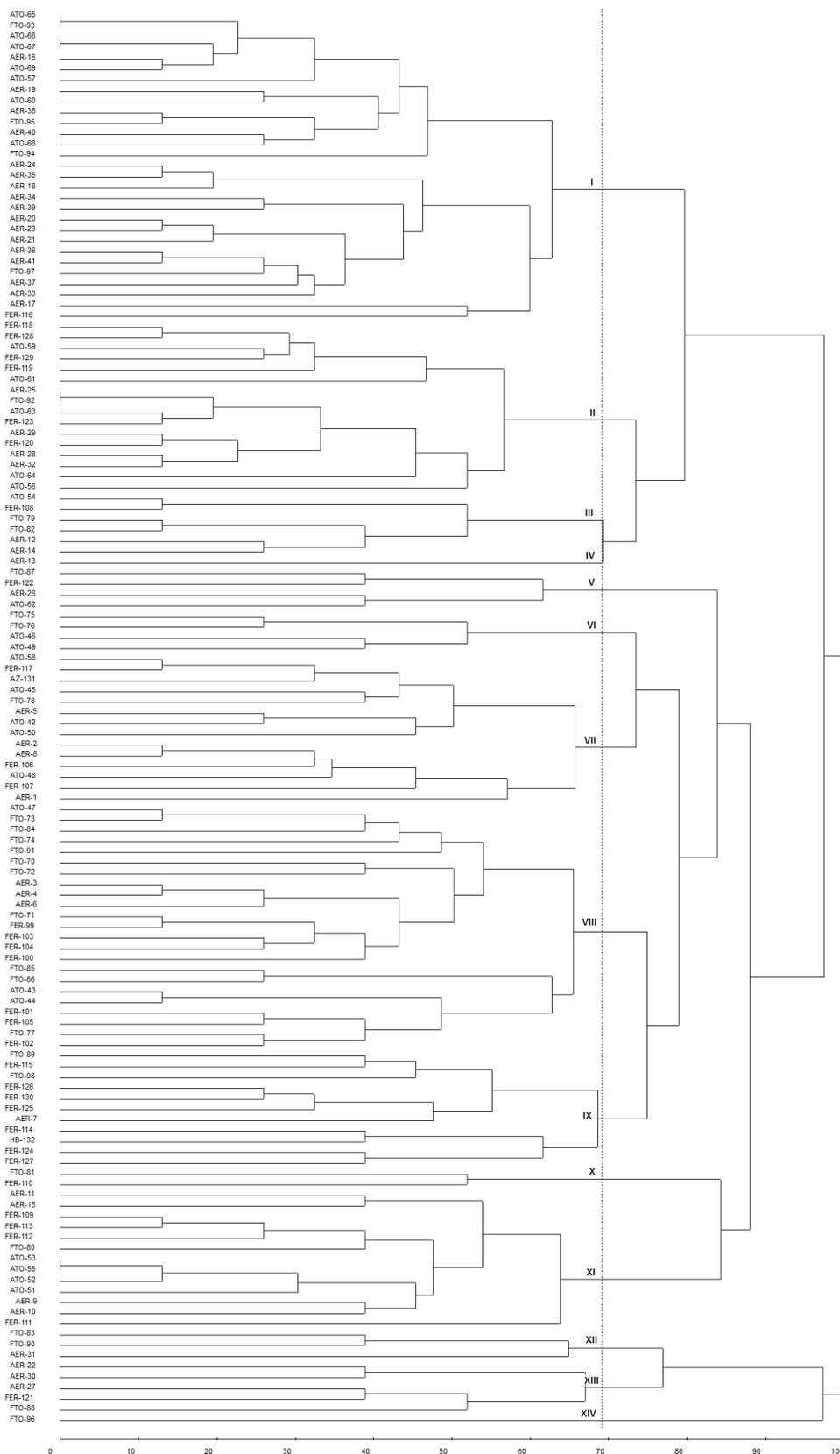


Figura 4. Dendrograma de dissimilaridade morfofisiológica de 130 isolados provenientes de diferentes solos de Entre Rios do Oeste e Toledo, estado do Paraná, entre outubro e dezembro de 2014, e das cepas referência, *H. seropedicae* (HB-132) e *A. brasilense* (AZ-131).

FER: solo de floresta de Entre Rios do Oeste; AER: solo agricultável de Entre Rios do Oeste; FTO: solo de floresta de Toledo; ATO: solo agricultável de Toledo.

Diferentemente, Nóbrega et al. (2004) apresentou um estudo de diversidade fenotípica e observou que os isolados não se relacionavam com as respectivas áreas de origem quando trata-se de áreas degradadas, as quais estavam sendo recompostas por estratégias específicas. Os agrupamentos não revelaram nenhuma condição que resultasse em distinção por origem do solo analisado.

As características morfológicas e fisiológicas são utilizadas para diferenciar bactérias quando avaliadas em conjunto, principalmente quando se utiliza meios que são elaborados com o objetivo de selecionar determinados gêneros. O parâmetro de comparação morfológica para caracterização de bactérias é bastante comum, principalmente em rizóbios. Medeiros et al. (2009) obtiveram 304 isolados de feijão-caupi com características típicas de rizóbio e ainda os agrupou em 18 grupos morfológicos para expressar a diversidade.

Pela caracterização morfológica em associação ao meio de cultura utilizado, Santos et al. (2015) sugeriram que os diazotróficos obtidos a partir de milho indicavam alguns dos isolados como *Azospirillum* spp. em meio JNFb, *Burkholderia* em JMV e *A. amazonense* em LGI, conforme apresentado por Döbereiner et al. (1995). Todavia, neste estudo nenhum isolado apresentou 100% de similaridade com as cepas de referência *H. seropedicae* e *A. brasilense*. Mesmo utilizando meios semi-específicos é possível o isolamento de outros gêneros com características semelhantes.

Nesse sentido, torna-se importante isolar e caracterizar as bactérias em regiões e culturas distintas a fim de se obter bactérias planta-específicas, pois as análises realizadas são indicativas da densidade e diversidade populacional existente em quinoa. Além disso, torna-se imprescindível a continuidade dos estudos com bactérias isoladas de uma cultura da qual pouco se conhece. Os isolados agrupados e caracterizados fenotipicamente são fundamentais para os testes de promoção de crescimento *in vitro* e *in vivo*.

4 CONCLUSÕES

1. Houve o isolamento 130 colônias de bactérias endofíticas, revelando sua associação a raízes de quinoa.
2. O número de bactérias endofíticas isoladas foi similar em Toledo e Entre Rios do Oeste, tanto em área agricultável como em área de floresta.
3. As populações de bactérias diazotróficas endofíticas foram detectadas apenas nas áreas agricultáveis de Toledo e Entre Rios do Oeste.
4. O processo de agrupamento permitiu identificar a formação de 14 grupos de bactérias por características morfofisiológicas em quinoa.

5 REFERÊNCIAS

- ANTONIO, C. S.; REIS, V. M. **Caracterização fisiológica de bactérias endofíticas isoladas de cana-de-açúcar plantada no Nordeste**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2011. 28p.
- BENEDUZI, A. et al. Genetic and phenotypic diversity of plant-growth-promoting bacilli isolated from wheat fields in southern Brazil. **Research in Microbiology**, v.159, p.244-250, 2008.
- BERGAMASCHI, C. et al. Ocorrência de bactérias diazotróficas associadas a cultivares de sorgo forrageiro. **Ciência Rural**, v.37, p.727-733, 2007.
- CRUZ, C. D. GENES – a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**, v.35, p. 271-276, 2013.
- DALL'ÓGLIO-CHAVES, E. I. **Diversidade de bactérias endofíticas obtidas de solos do Oeste do Paraná usando milho e trigo como planta isca**. 2013. 150p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon.
- DÖBEREINER, J. et al. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1995, 60 p.
- DÖBEREINER, J. et al. **Protocolos para preparo de meios de cultura**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1999. 38 p.
- EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Sistema brasileiro de classificação de solos. 2. ed. Brasília: EMBRAPA-SPI, 2006, 306 p.
- HUNGRIA, M.; SILVA, K. **Manual de curadores de germoplasma-micro-organismos: rizóbios e bactérias promotoras do crescimento vegetal**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2011. 21p.
- IKEDA, A. C. **Caracterização morfofisiológica e genética de bactérias endofíticas isoladas de raízes de diferentes genótipos de milho (*Zea mays* L.)**. 2010. 100 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- LODEWYCKX, C. et al. Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 21, p. 583-606, 2002.
- MADIGAN, M. T.; BROCK, T. D.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160p.
- MEDEIROS, E. V. et al. Diversidade morfológica de rizóbios isolados de caupi cultivado em solos do Estado do Rio Grande do Norte. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.31, p.529-535, 2009.

MIRANDA, M. et al. Impact of air-drying temperature on nutritional properties, total phenolic content and antioxidant capacity of quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd.). **Industrial Crops and Products**, v.32, p.258-263, 2010.

MOREIRA, F. M. S. et al. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v.1, p.74-99, 2010.

MUJICA, A.; JACOBSEN, S. La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) y sus parientes silvestres. In: MORAES, M. et al. (Eds.). **Botánica Económica de los Andes Centrales**, La Paz: Universidad Mayor de San Andrés, 2006, p. 449-457.

NÓBREGA, R. S. A. et al. Caracterização fenotípica e diversidade de bactérias diazotróficas associativas isoladas de solos em reabilitação após a mineração de bauxita. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.28, p.269-274, 2004.

PEDRINHO, E A. N. et al. Identificação e avaliação de rizobactérias isoladas de raízes de milho. **Bragantia**, v.69, p.905-911, 2010.

PERALTA, E. et al. **Manual agrícola de granos andinos**: chocho, quinua, amaranto y ataco. Quito: INIAP, 2012. 68p.

RODRIGUES, L. S. et al. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do arroz inundado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.275-284, 2006.

ROESCH, L. F. W. et al. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a plantas de milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.31, p.1367-1380, 2007.

SANTOS, J. S. et al. Inoculation and isolation of plant growth-promoting bacteria in maize grown in Vitória da Conquista, Bahia, Brazil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.39, p.78-85, 2015.

SILVEIRA, A. A.; GRANADA, C. E. Isolamento e caracterização de bactérias promotoras de crescimento vegetal. In: SPEROTTO, R. A. **Protocolos e métodos de análise de laboratórios de biotecnologia agroalimentar e de saúde humana**. Lajeado: Univates, 2014. 329p.

SPEHAR, C. R. Adaptação da quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) para incrementar a diversidade agrícola e alimentar no Brasil. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v.23, p.41-62, 2006.

SPEHAR, C. R.; ROCHA, J. E. da S.; SANTOS, R. L. B. Desempenho agrônômico e recomendações para o cultivo da quinua (BRS Syetetuba) no cerrado. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 41, p.145-147, 2011.

VIDEIRA, S. H.; ARAÚJO, J. L. S.; BALDANI, V. L. D. **Metodologia para isolamento e posicionamento taxonômico de bactérias diazotróficas oriundas de plantas não-leguminosas**. Rio de Janeiro: Embrapa, 2007, 74 p.

VIDEIRA, S. H. et al. Genetic diversity and plant growth promoting traits of diazotrophic bacteria isolated from two *Pennisetum purpureum* Schum. genotypes grown in the field. **Plant Soil**, v. 356, p.51-66, 2011.

CAPÍTULO III – SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO E PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOLÁCETICO *IN VITRO* POR BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS

RESUMO

As bactérias promotoras de crescimento vegetal são caracterizadas por gerar benefícios sobre o crescimento e desenvolvimento das plantas, podendo viver no interior dos tecidos das plantas sem causar efeitos deletérios. O objetivo deste trabalho foi caracterizar bactérias endofíticas isoladas de plantas iscas de quinoa, cultivadas em solos da região oeste do Paraná, quanto à produção de ácido indolacético (AIA) e solubilização de fosfato. Um total de 130 bactérias isoladas a partir de raízes de plantas de quinoa cultivadas em solo de floresta e agricultáveis de Entre Rios do Oeste e de Toledo foram crescidas em meio DYGS por 48 horas. Em seguida, as bactérias foram avaliadas quantitativamente em relação à produção de AIA em espectrofotômetro e qualitativamente quanto à solubilização de fosfato em meio NBRIP sólido para a formação de halo característico. Todas as bactérias produziram AIA em maior ou menor quantidade, com variação de 0,90 a 63,42 $\mu\text{g mg}^{-1}$ de proteína. No entanto, apenas 40% dos isolados apresentou halo de solubilização, sendo que 13% apresentaram baixo índice de solubilização ($IS < 2$), 21% médio ($2 \leq IS < 4$) e 7% alto índice de solubilização de fosfato ($IS > 4$). Portanto, os isolados que solubilizaram fosfato e produziram AIA são potenciais promotores de crescimento de plantas de quinoa, podendo ser utilizados em futuras pesquisas em condição de campo.

Palavras-chave: Quinoa, NBRIP, promoção de crescimento.

PHOSPHATE SOLUBILIZATION AND INDOLE ACID ACETIC PRODUCTION *IN VITRO* BY ENDOPHYTIC BACTERIA

ABSTRACT

Plant growth-promoting bacteria are characterized by promoting benefits on growth and development of plants. They can live in the plant tissues without causing deleterious effects. The aim of this study was to characterize endophytic bacteria isolated from bait plant quinoa grown in soils of the western region of Paraná, for their production of indole acetic acid (IAA) and phosphate solubilization. A total of 130 bacteria isolated from quinoa roots grown in forest and arable soils of Entre Rios do Oeste and Toledo were grown in DYGS medium for 48 hours. After that, bacteria were quantitatively evaluated for the production of IAA in spectrophotometer and qualitatively on the phosphate solubilization in solid NBRIP medium for the formation of characteristic halo. All bacteria produced IAA in a larger or smaller amount with the range of 0.90 to 63.42 $\mu\text{g mg}^{-1}$ of protein. However, only 40% of the isolates showed solubilization halo, whereas 13% had low solubility index ($\text{SI} < 2$), medium 21% ($2 \leq \text{SI} < 4$), and 7% higher phosphate solubilization index ($\text{SI} > 4$). Therefore, the isolates phosphate solubilizing and IAA producer are potential plant growth promoter of quinoa plants, which can be used in future studies under field conditions.

Keywords: Quinoa, NBRIP, growth promotion.

1 INTRODUÇÃO

Bactérias que habitam as raízes de plantas e exercem efeitos positivos sobre elas são denominadas bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) (KUSS et al., 2007). Há uma grande diversidade de microrganismos no solo, principalmente na rizosfera. Estes microrganismos se beneficiam dos exsudados das raízes das plantas e podem se estabelecer na rizosfera (rizosféricas), se associar com as plantas (associativas) ou viver no interior de seus tecidos (endofíticas) (SALA; FREITAS; SILVEIRA, 2007).

As bactérias endofíticas têm um elevado potencial para aumentar a produtividade por meio da fixação biológica de nitrogênio e promoção de crescimento, neste último caso, aumentando a absorção de água e nutrientes pelas plantas (IKEDA et al., 2012) por meio da produção de fitohormônios, principalmente auxinas. Além disso, pode sintetizar sideróforos que solubilizam e sequestram ferro do solo, e a solubilização de fósforo, deixando estes minerais disponíveis para as plantas (LODEWYCKX et al., 2002).

O fósforo é vital para todos os seres vivos e primordial para as plantas, no entanto, apenas 5% do fosfato total do solo está disponível (EPSTEIN; BLOOM, 2006). Nas plantas, a deficiência de fósforo causa menor desenvolvimento de raízes e de brotações, coloração verde escura nas folhas, as quais podem conter manchas necróticas (TAIZ; ZIEGLER, 2009) se comparado à plantas da mesma espécie sem esta deficiência.

Assim como o nitrogênio, o fósforo é um elemento essencial, porém quando aplicado acaba se tornando indisponível para as plantas, pois é rapidamente imobilizado por diversos íons em diferentes tipos de solo (MOREIRA et al., 2010). As bactérias endofíticas com capacidade de solubilizar fosfato são importantes durante o processo de colonização, pois podem inicialmente colonizar o hospedeiro e conseqüentemente provê-lo desse mineral, auxiliando no desenvolvimento vegetal (PEDRINHO, 2009).

Outra característica importante das BPCV é a produção de fitohormônios, principalmente o ácido indolacético (AIA). O AIA é a auxina mais abundante e de maior relevância fisiológica. A biossíntese de AIA está associada aos tecidos com rápida divisão celular e crescimento, especialmente em partes aéreas (TAIZ; ZIEGLER, 2009). Um dos efeitos mais característicos na morfologia das plantas

inoculadas com bactérias que sintetizam AIA é o alongamento das raízes e aumento dos pêlos radiculares. Os dados obtidos por Radwan, Mohamed e Reis (2004) corroboram este fato, e observam que o alongamento radicular está diretamente relacionado à produção de AIA, afirmando que este parâmetro pode ser usado como um bioensaio para quantificar a produção desta auxina.

O estudo das interações entre planta e microrganismos vem se intensificando nos últimos anos, com o intuito de entender os vários fatores envolvidos na seleção de estirpes de bactérias eficientes em promover o crescimento de diferentes culturas (FERREIRA; KNUPP; MARTIN-DIDONET, 2014). Por isso, o objetivo deste trabalho foi caracterizar bactérias endofíticas isoladas de plantas iscas de quinoa, cultivadas em solos da região oeste do Paraná, quanto à produção de ácido indolacético (AIA) e solubilização de fosfato.

2 MATERIAL E MÉTODOS

As bactérias endofíticas avaliadas são oriundas do isolamento a partir de raízes de plantas-isca de quinoa em quatro áreas: área de floresta e área agricultável da Fazenda Experimental de Entre Rios do Oeste/PR, pertencentes à UNIOESTE, designados FER e AER, respectivamente; área de Floresta Estacional Semidecidual e área agricultável da Fazenda Experimental da PUCPR *Campus* de Toledo/PR, designados FTO e ATO. Os solos das quatro áreas são classificados como LATOSSOLO VERMELHO Distroférico (EMBRAPA, 2006). Utilizaram-se plantas de quinoa como isca para o isolamento das bactérias. A quinoa pertence ao genótipo Q12 23 oriunda do programa de Melhoramento de Quinoa da UNIOESTE. As análises realizadas partiram de um total de 130 bactérias endofíticas, sendo 32 isoladas da área de floresta e 41 da área agricultável de Entre Rios do Oeste, 29 da área de floresta e 28 da área agricultável de Toledo.

Os isolados foram inoculados em erlemeyers contendo 10 mL de meio de cultura DYGS e foram incubados por 48 horas a 30°C em agitador de movimento orbital. Após o período de crescimento o meio se tornou turvo. O conteúdo foi despejado em tubos falcon de 15 mL e centrifugados a 3200 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi vertido fora e adicionou-se 5 mL de solução salina 0,85%. Em câmara de fluxo laminar, retirou-se 2 mL deste conteúdo para determinação da densidade ótica (DO) de cada isolado e padronizou-se a DO de 0,5 em espectrofotômetro a 600 nm. Nos tubos falcon os 3 mL restantes foram ajustados com a mesma proporção de solução salina (KUSS et al., 2007).

Para a quantificação do ácido indolacético (AIA), alíquotas de 500 µl das amostras ajustadas para DO 0,5 foram inoculadas em erlemeyers contendo 20 mL de meio DYGS em 3 repetições. Foram incubados em agitador de movimento orbital a 120 rpm por 72 horas a 30°C. Após este período, 2 mL de cada isolado foi transferido para microtubos e centrifugados em centrífuga refrigerada a 11.180 rpm (10.000 g) por 10 minutos a 4°C. Do sobrenadante obtido, 1,8 mL foi transferido para tubos de ensaio de 10 mL, aos quais foram adicionados 1,2 mL do reagente de Salkowski (SARWAR; KREMER, 1995). A massa de bactérias restante do microtubo foi congelada para posterior determinação de proteínas. Os tubos de ensaio contendo o sobrenadante e o reagente de Salkowski foram reservados por 30 minutos em ambiente escuro para desenvolvimento da cor rósea. A intensidade da

cor foi determinada em espectrofotômetro a 535 nm (ASGHAR et al., 2002). As concentrações de AIA foram determinadas por meio de uma curva padrão previamente preparada com concentrações conhecidas de ácido indolacético (AIA) de 0; 2,5; 5; 10; 15; 20 e 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

A determinação da concentração de proteínas foi realizada segundo a metodologia proposta por Bradford (1976). Para tanto, foi utilizada a massa de bactérias obtida do crescimento para determinação do teor de AIA. A massa de bactérias foi retirada do congelador e a estas foi adicionado 1 mL de meio DYGS. O material foi agitado até completa homogeneidade. Retirou-se uma alíquota de 100 μl para um tubo de ensaio de 10 mL e adicionou-se 100 μl de NaOH 0,1 M. Os tubos foram levemente agitados e levados ao banho-maria por 5 minutos a 70°C para completa lise celular. Após, adicionou-se 2 mL do reagente de Bradford previamente preparado. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 595nm. Os valores resultantes foram comparados com concentrações conhecidas de soroalbumina bovina (BSA). A curva padrão foi preparada com concentrações de 0, 20, 60, 100, 140, 180 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

A avaliação qualitativa da solubilização de fosfato foi feita através da metodologia proposta por Nautiyal et al. (2000) em meio de cultura sólido NBRIP. Com a agulha de platina tocou-se na colônia do isolado e se encostou levemente em 4 pontos na placa do meio de cultura NBRIP. Em cada placa havia um isolado com 4 repetições que foram incubadas em estufa a 28°C por 6 dias. Decorrido este tempo foi realizada a avaliação da solubilização por meio da medição do diâmetro do halo de solubilização, e do halo da colônia com o auxílio de uma régua graduada. A partir dessas medidas, foi obtido o índice de solubilização (IS) para cada isolado por meio da fórmula:
$$\text{IS} = \frac{d \text{ Halo (mm)}}{d \text{ Colônia (mm)}}$$
 (BERRAQUEIRO; BAYA; CORMENZANA, 1976), sendo d o diâmetro do halo ou da colônia. Os isolados foram classificados de acordo com os índices obtidos, em bactérias com baixa ($\text{IS} < 2$), média ($2 \leq \text{IS} < 4$) e alta ($\text{IS} \geq 4$) capacidade de solubilização de fosfato.

Os dados de produção de AIA dos isolados em cada local foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e as médias agrupadas pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do aplicativo computacional GENES (CRUZ, 2013).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os isolados foram capazes de produzir compostos indólicos. Em Entre Rios do Oeste (Tabela 1) a produção de AIA pelos isolados em solo de área de floresta (FER) variou de 3,32 a 56,58 $\mu\text{g mg}^{-1}$ de proteína e de 1,36 a 62,94 $\mu\text{g mg}^{-1}$ de proteína na área agricultável (AER). Em Toledo (Tabela 2) a variação foi de 1,80 a 38,91 $\mu\text{g mg}^{-1}$ de proteína para os isolados em área de floresta (FTO) e de 0,90 a 63,42 $\mu\text{g mg}^{-1}$ de proteína dos isolados em área agricultável (ATO).

Kuss et al. (2007) testaram a produção de AIA por bactérias diazotróficas endofíticas obtidas de cultivares de arroz e verificaram que todos os isolados produziram AIA, que variou de 2,79 a 13,47 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Beneduzi et al. (2008) obtiveram uma variação maior nos valores de produção de AIA, 0,1 a 269,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em isolados da rizosfera e do solo. Apesar das bactérias de solo ser encontradas em maior número, a produção de compostos indólicos nas bactérias isoladas da rizosfera do trigo foram mais eficientes na produção de compostos indólicos em comparação aos isolados do solo. Essa distribuição pode ser atribuída a muitos fatores como a morfologia das raízes, o estágio de desenvolvimento das plantas, os exsudados das raízes e as propriedades físicas e químicas do solo.

A produção de AIA por *Herbaspirillum* (4,82 $\mu\text{g mg}^{-1}$ de proteína) e *Azospirillum* (6,28 $\mu\text{g mg}^{-1}$ de proteína) foi inferior à maioria dos demais isolados. Em todas as áreas observou-se que ambas as cepas de referência se colocaram no grupo com menor produção de compostos indólicos. Santos et al. (2015) encontraram maiores valores de produção de AIA para *Azospirillum* em comparação à *Herbaspirillum* spp. No presente trabalho ambas pertencem ao mesmo grupo.

Kuss et al. (2007) avaliaram a produção do fitohormônio ácido indolacético (AIA) e o potencial de fixação biológica de bactérias isoladas nos meios NFb, LGI e LGI-P e constataram que algumas destas produziram mais AIA se comparadas com *A. lipoferum* e *A. brasilense*, apesar de não se destacarem na fixação biológica de nitrogênio.

Tabela 1. Produção de Ácido Indolacético (AIA) e solubilização de fosfato das estirpes bacterianas isoladas nas áreas Agricultável e de Floresta de Entre Rios do Oeste/PR entre outubro e dezembro de 2014

Isolado AER ^a	AIA		Solubilização fosfato		Isolado FER ^a	AIA		Solubilização fosfato	
	$\mu\text{g mg}^{-1}$ prot		IS ^b	CS ^c		$\mu\text{g mg}^{-1}$ prot		IS ^b	CS ^c
AER-4	62,94	a	2,10	média	FER-100	56,58	a	0,00	ns
AER-30	32,62	b	0,00	ns	FER-121	40,48	b	0,00	ns
AER-24	29,64	b	2,74	média	FER-127	24,78	c	0,00	ns
AER-29	29,14	b	0,00	ns	FER-119	21,14	c	0,00	ns
AER-32	28,69	b	1,48	baixa	FER-123	15,28	d	0,00	ns
AER-23	26,46	c	1,79	baixa	FER-120	13,50	d	0,00	ns
AER-1	26,01	c	0,00	ns	FER-107	11,28	e	2,08	média
AER-33	25,19	c	2,00	média	FER-99	11,23	e	0,00	ns
AER-22	23,19	d	0,00	ns	FER-114	10,18	e	4,45	alta
AER-38	22,51	d	1,19	baixa	FER-130	9,63	e	0,00	ns
AER-7	21,95	d	0,00	ns	FER-126	9,16	e	0,00	ns
AER-13	21,11	d	0,00	ns	FER-103	8,68	e	0,00	ns
AER-3	20,11	d	2,68	média	FER-124	8,24	e	1,60	baixa
AER-35	19,83	d	0,00	ns	FER-101	7,90	e	0,00	ns
AER-31	16,50	e	0,00	ns	FER-102	7,57	e	1,17	baixa
AER-10	14,95	e	4,18	alta	FER-115	7,53	e	0,00	ns
AER-34	14,86	e	0,00	ns	FER-110	7,40	e	0,00	ns
AER-20	14,65	e	2,21	média	FER-104	7,12	e	0,00	ns
AER-16	14,64	e	0,00	ns	FER-118	7,10	e	0,00	ns
AER-9	13,13	f	2,61	média	FER-113	6,97	e	4,29	alta
AER-17	12,37	f	0,00	ns	AZ-131	6,28	e	0,00	ns
AER-15	12,36	f	3,56	média	FER-108	6,07	e	0,00	ns
AER-21	11,74	f	3,36	média	FER-106	5,40	e	0,00	ns
AER-25	11,56	f	1,13	baixa	FER-112	5,03	e	0,00	ns
AER-41	11,16	f	0,00	ns	FER-117	4,99	e	5,79	alta
AER-28	10,66	f	1,13	baixa	HB-132	4,82	e	0,00	ns
AER-40	9,99	f	0,00	ns	FER-109	4,79	e	3,90	média
AER-8	8,81	g	0,00	ns	FER-116	4,60	e	0,00	ns
AER-19	8,49	g	0,00	ns	FER-111	4,37	e	0,00	ns
AER-14	8,05	g	0,00	ns	FER-122	3,80	e	4,78	alta
AER-39	7,94	g	2,59	média	FER-125	3,32	e	0,00	ns
AZ-131	6,28	h	0,00	ns	FER-105	sc	0,00	ns	
AER-36	5,95	h	2,54	média	FER-128	sc	0,00	ns	
AER-18	5,82	h	0,00	ns	FER-129	sc	0,00	ns	
AER-26	5,22	h	3,85	média					
AER-6	5,02	h	1,82	baixa					
HB-132	4,82	h	0,00	ns					
AER-12	4,45	h	0,00	ns					
AER-11	4,37	h	2,34	média					
AER-27	4,37	h	2,11	média					
AER-37	1,36	h	2,23	média					
AER-2	sc		1,89	baixa					
AER-5	sc		2,73	média					
CV%	13,92				CV%	45,47			
r	-0,02				r	-0,21			

Médias seguidas da mesma letra na coluna pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

^a Isolados das áreas AER: Agricultável de Entre Rios do Oeste e FER: Floresta de Entre Rios do Oeste

^b Índice de Solubilização de Fosfato: d Halo (mm)/ d Colônia (mm)

^c Capacidade de Solubilização de Fosfato de acordo com o Índice de Solubilização de Fosfato: baixa (IS<2), média (2≤ IS <4) e alta (IS≥4) capacidade de solubilização de fosfato

* ns: não solubilizou; sc: sem crescimento; r: coeficiente de correlação entre produção de AIA e ISF

Na área agricultável de Entre Rios do Oeste o isolado mais eficiente na produção de AIA foi o AER-4 (62,94 $\mu\text{g mg}^{-1}$ de proteína); na área de floresta do mesmo município foi o FER-100 (56,58 $\mu\text{g mg}^{-1}$ de proteína); na área agricultável de Toledo destacou-se o isolado ATO-63 (63,42 $\mu\text{g mg}^{-1}$ de proteína) e na área de floresta de Toledo o FTO-86 (38,91 $\mu\text{g mg}^{-1}$ de proteína) (Tabelas 1 e 2).

Tabela 2. Produção de Ácido Indolacético (AIA) e solubilização de fosfato das estirpes bacterianas isoladas nas áreas Agricultável e de Floresta de Toledo/PR entre outubro e dezembro de 2014

Isolado ATO	AIA		Solubilização fosfato		Isolado FTO	AIA		Solubilização fosfato	
	$\mu\text{g mg}^{-1}$	prot	IS ¹	CS ²		$\mu\text{g mg}^{-1}$	prot	IS ¹	CS ²
ATO-63	63,42	a	0,00	ns	FTO-86	38,91	a	0,00	ns
ATO-51	58,63	b	0,00	ns	FTO-98	36,04	b	1,28	baixa
ATO-67	38,98	c	0,00	ns	FTO-88	34,17	b	0,00	ns
ATO-68	16,48	d	0,00	ns	FTO-70	27,98	c	0,00	ns
ATO-58	16,22	d	0,00	ns	FTO-87	22,30	d	2,78	média
ATO-46	15,89	d	0,00	ns	FTO-72	19,31	e	0,00	ns
ATO-48	14,48	d	0,00	ns	FTO-94	15,92	f	0,00	ns
ATO-43	9,48	e	5,56	alta	FTO-97	15,85	f	2,27	média
ATO-50	9,28	e	1,79	baixa	FTO-80	14,51	f	0,00	ns
ATO-45	8,57	e	0,00	ns	FTO-89	11,92	g	1,58	baixa
ATO-44	8,53	e	0,00	ns	FTO-93	11,48	g	1,75	baixa
ATO-52	8,51	e	3,08	média	FTO-73	11,21	g	0,00	ns
ATO-49	8,42	e	0,00	ns	FTO-78	10,94	g	-	sc
ATO-42	7,58	e	3,32	média	FTO-84	10,20	g	4,36	alta
AZ-131	6,28	f	0,00	ns	FTO-75	9,88	g	0,00	ns
ATO-60	5,72	f	1,76	baixa	FTO-82	9,44	g	0,00	ns
HB-132	4,82	f	0,00	ns	FTO-85	8,86	h	0,00	ns
ATO-57	4,68	f	3,95	média	FTO-96	8,01	h	0,00	ns
ATO-69	4,50	f	2,73	média	FTO-92	7,95	h	0,00	ns
ATO-47	4,34	f	0,00	ns	FTO-77	6,86	h	0,00	ns
ATO-55	3,92	f	3,53	média	FTO-79	6,65	h	0,00	ns
ATO-56	3,59	f	0,00	ns	FTO-81	6,59	h	1,94	baixa
ATO-54	3,52	f	0,00	ns	FTO-71	6,30	h	0,00	ns
ATO-64	3,18	f	1,44	baixa	AZ-131	6,28	h	0,00	ns
ATO-62	2,45	f	1,87	baixa	FTO-76	6,10	h	0,00	ns
ATO-66	2,37	f	4,53	alta	HB-132	4,82	i	0,00	ns
ATO-53	2,09	f	3,53	média	FTO-83	4,61	i	0,00	ns
ATO-61	1,43	f	0,00	ns	FTO-90	3,66	i	0,00	ns
ATO-65	1,13	f	0,00	ns	FTO-91	3,62	i	0,00	ns
ATO-59	0,90	f	4,19	alta	FTO-95	3,25	i	0,00	ns
					FTO-74	1,80	i	0,00	ns
CV%	18,97				CV%	16,94			
r	-0,33				r	0,20			

Médias seguidas da mesma letra na coluna pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

^a Isolados das áreas AER: Agricultável de Toledo e FER: Floresta de Toledo.

^b Índice de Solubilização de Fosfato: d Halo (mm)/ d Colônia (mm)

^c Capacidade de Solubilização de Fosfato de acordo com o Índice de Solubilização de Fosfato: baixa (IS<2), média (2≤ IS <4) e alta (IS≥4) capacidade de solubilização de fosfato

* ns: não solubilizou; sc: sem crescimento; r: coeficiente de correlação entre produção de AIA e ISF

Assumpção et al. (2009) obtiveram valores de produção de AIA por bactérias diazotróficas endofíticas isoladas de soja que variaram de 2,6 a 34,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$, quando quantificados em meio de cultura. Quando submetidos a testes em casa de vegetação apenas um dos isolados se mostrou eficiente no aumento da biomassa seca de raiz, enquanto os demais foram similares ou inferiores ao controle sem inoculação de bactérias. Olivares, Reis e Façanha (2002) demonstraram que a inoculação de cana-de-açúcar com cepas de *G. diazotrophicus* altera as condições anatômicas e fisiológicas das plantas hospedeiras, como o aumento na emergência de raízes laterais finas e do sistema radicular no geral.

Apesar de um dos atributos das BPCV ser a produção de fitohormônios, principalmente o AIA, é importante salientar que a capacidade de produzir altas concentrações de indóis não é necessariamente garantia de que haverá incremento no crescimento destas plantas, uma vez que a concentração elevada de AIA pode ter efeitos deletérios (SALA; SILVEIRA; CARDOSO, 2007). A produção de AIA é apenas um dos fatores que pode favorecer o desenvolvimento das plantas. Ji, Gururani e Chun (2014) encontraram diferenças morfológicas entre cultivares de arroz que foram tratados com isolados de BPCV gerando efeitos positivos no crescimento e desenvolvimento das plantas. Estes isolados obtiveram resultados expressivos na produção de auxinas e sideróforos, solubilização de fosfato e antagonismo contra duas espécies de fungos. Isso reforça a hipótese de que pode haver mais de uma característica de promoção de crescimento que ajam de forma conjunta de modo a auxiliar no desenvolvimento das plantas.

As cepas de BPCV tem potencial para outras características benéficas e produzem efeitos positivos no desenvolvimento vegetal. A capacidade de solubilização de fosfato está difundida em bactérias associadas às plantas e de solo. No teste de solubilização de fosfato, a produção de uma zona clara ao redor das colônias bacterianas em meio de cultura contendo fosfato é a indicação da presença de solubilizadores de fosfato. A medida do halo em relação ao crescimento da bactéria gera o índice de solubilização. Observou-se que do total de isolados, considerando-se as quatro áreas, 60% não foi capaz de solubilizar fosfato, 13% apresentaram baixo índice de solubilização ($IS < 2$), 19% médio ($IS < 4$) e 7% alto índice de solubilização de fosfato ($IS > 4$) (Figura 1).

A maioria das bactérias isoladas das áreas de floresta de Toledo e Entre Rios não solubilizou fosfato, correspondendo a 72% e 75% dos isolados,

respectivamente (Figura 1). As características físicas e químicas do solo podem ter influenciado a distribuição ecológica destas bactérias, uma vez que os endofíticos se originam de solos onde as plantas hospedeiras são cultivadas, assim como os fatores aleatórios que dependem da probabilidade com que ocorre a interação planta-bactéria induzem a colonização das plantas por diferentes bactérias, determinando sua composição bacteriana endofítica (HARDOIM; OVERBEEK; ELSAS, 2008).

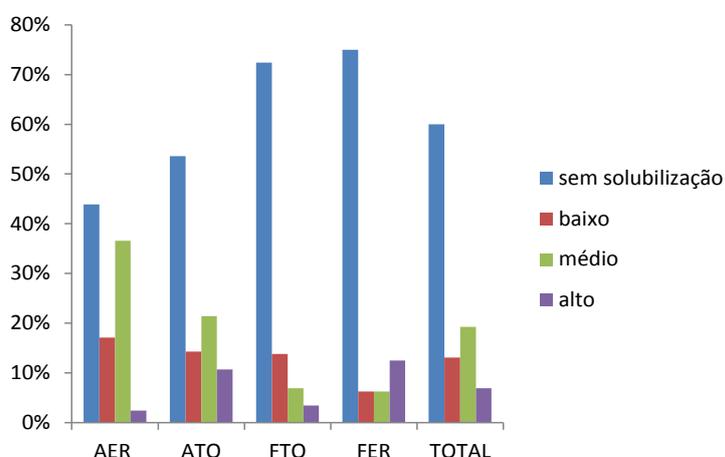


Figura 1. Isolados distribuídos por capacidade de solubilização de fosfato nas áreas avaliadas. AER: Agricultável de Entre Rios do Oeste; ATO: Agricultável de Toledo; FTO: Floresta de Toledo; FER: Floresta de Entre Rios do Oeste

Os isolados que apresentaram alto índice de solubilização de fosfato foram o AER-10 (IS 4,18), ATO-43 (IS 5,56), ATO-59 (IS 4,19), ATO-66 (IS 4,53), FTO-80 (IS 4,36), FER-114 (IS 4,45), FER-117 (IS 5,79), FER-113 (IS 4,29) e FER-122 (4,78) (Tabelas 1 e 2). Estes índices foram superiores aos encontrados por Marra et al. (2012) em isolados de feijão de corda como plantas isca em solos com alta disponibilidade de fósforo insolúvel. A avaliação da solubilização em meio sólido demonstrou que o índice de solubilização de suas cepas teve valores de baixo a médio, sendo que o maior índice foi de 3,55 referente ao isolado identificado como *Acinetobacter* sp. Islam et al. (2007), no entanto, encontraram o índice de 6,7 para *Acinetobacter* sp. BR-25 e 4,6 para *Acinetobacter* sp. BR-12 isolados de arroz em meio NBRIP. Além disso, relataram que o valor do pH dos meios de cultura diminui

com o crescimento bacteriano sugerindo que a secreção de ácidos orgânicos pela bactéria pode desempenhar papel na capacidade de solubilização de fosfato. Corroborando este fato, Ribeiro e Cardoso (2012) atribuíram a solubilização do fosfato das bactérias isoladas em araucária a uma diminuição do pH nos meios de cultura, causada pela produção de ácidos orgânicos pelas bactérias.

PANHWAR et al. (2012) determinaram a produção de ácidos orgânicos em sete cepas isoladas de arroz que tiveram o maior valor de produção em meio NBRIP contendo fosfato tricálcico. Os microrganismos que produziram halos em placas contendo meios fosfatados foram capazes de produzirem ácidos orgânicos.

Qualitativamente, pode-se dizer que a minoria dos isolados solubilizou fosfato em contraste ao resultado apresentado por Panhwar et al. (2012), onde todas as cepas isoladas foram eficientes na solubilização de fosfato em meio NBRIP, porém em termos numéricos os dados apresentados neste trabalho são muito significativos, uma vez que, 51 isolados puderam solubilizar fosfato. Neste aspecto, Pedrinho et al. (2010) classificaram pelo sequenciamento parcial do gene 16S rRNA os 27 isolados positivos para a prova de solubilização e os identificou como pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Burkholderia*, *Sphingomonas*, *Pantoea* e *Azospirillum*. Esses resultados demonstram a grande diversidade de microrganismos presentes nas mais diversas plantas e no solo como solubilizadores de fosfato.

Em um estudo envolvendo a inoculação das bactérias endofíticas *Burkholderia* sp. e *Herbaspirillum* sp. testadas anteriormente, quanto à solubilização de fosfato e fixação de nitrogênio, Baldotto et al. (2012) comprovaram que houve aumento nos níveis de nutrientes nas folhas do milho, assim como maiores taxas de crescimento da parte aérea e raízes da planta.

Embora, plantas inoculadas com bactérias com características de fixação de nitrogênio e solubilização de fosfato aumentem os níveis de N, P e K na planta, Souza et al. (2012) ao inocular bactérias incapazes de solubilizar fosfato *in vitro* e com baixa capacidade de reduzir acetileno ainda sim obtiveram resultados nutricionais positivos. Desta forma, pode-se inferir que outros mecanismos de promoção de crescimento como a produção de AIA por meio do desenvolvimento radicular permita que a planta possa explorar mais o solo e conseqüentemente, aumentar os níveis de nutrientes.

Nos isolados obtidos não houve correlação entre a solubilização de fosfato e a produção de AIA em nenhuma das áreas (Tabelas 1 e 2). No entanto, cepas

bacterianas com a combinação de mais de uma característica de promoção de crescimento tem resultado com efeitos positivos significativos no desenvolvimento das plantas. Diversas espécies do gênero *Pseudomonas* com altos níveis atividade da ACC deaminase, médio nível de produção de AIA e moderado a altos níveis de produção de sideróforos tiveram resultados expressivos no alongamento de raízes de canola em comparação a bactérias com apenas uma ou outra característica (RASHID; CHARLES; GLICK, 2012).

Todos os atributos positivos, juntamente com as características fisiológicas, como a produção de indóis, provável fixação de nitrogênio e solubilização de fosfato faz os microrganismos isolados, estrategicamente, interessantes para a exploração e um programa de biofertilizantes (VIDEIRA et al., 2011). Isso pode acontecer, principalmente em solos tropicais com alta absorção e fixação de fósforo, que possuem geralmente baixo pH e textura argilosa, estas características tem sido alteradas com o uso de fertilizantes químicos, resultando em um impacto negativo nos ecossistemas (SALCEDO; PRIETO; CORREA, 2014).

Testes em casa de vegetação e no campo são necessários para confirmar as características testadas *in vitro* na promoção de crescimento de plantas de quinoa, porém os isolados com alto índice de solubilização de fosfato e produção de AIA apresentam potencial para uso como biofertilizantes.

4 CONCLUSÕES

1. Todas as bactérias endofíticas testadas foram capazes de produzir ácido indolacético *in vitro*, porém, com grande variação na quantidade, independente de seu local de origem.
2. A solubilização de fosfato ocorreu em 40% dos isolados, sendo que 7% apresentou alto índice de solubilização.

5 REFERÊNCIAS

- ASGHAR, H. N. et al. Relationship between *in vitro* production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. **Biology and Fertility of Soils**, v. 35, p. 231-237, 2002.
- ASSUMPÇÃO, L. C. et al. Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p. 503-510, 2009.
- BALDOTTO, L. E. B. et al. Initial growth of maize in response to application of rock phosphate, vermicompost and endophytic bacteria. **Revista Ceres**, v. 59, n. 2, p. 262-270, 2012.
- BENEDUZI, A. et al. Genetic and phenotypic diversity of plant-growth-promoting bacilli isolated from wheat fields in southern Brazil. **Research in Microbiology**, v. 159, p. 244-250, 2008.
- BERRAQUEIRO, F. R.; BAYA, A. M.; CORMENZANA, A. R. Estabelecimento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. **ARS Pharmaceutica**, v. 17, p. 399-406, 1976.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CRUZ, C. D. GENES – a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**, v.35, p. 271-276, 2013.
- EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Sistema brasileiro de classificação de solos. 2. ed. Brasília: EMBRAPA-SPI, 2006, 306 p.
- EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. **Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas**. Londrina: Editora Planta, 2006, 402 p.
- FERREIRA, E. P. B.; KNUPP, A. M.; MARTIN-DIDONET, C. C. G. Crescimento de cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) influenciado pela inoculação com bactérias promotoras de crescimento de plantas. **Bioscience Journal**, v.30, p. 655-665, 2014.
- IKEDA, A. C. et al. Morphological and genetic characterization of endophytic bacteria isolated from roots of different maize genotypes. **Microbial Ecology**, v. 65, p. 154-160, 2012.
- ISLAM, T. et al. Isolation and identification of potential phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of *Oryza sativa* L. cv. BR29 of Bangladesh. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 62, p. 103-110, 2007.

JI, S. H.; GURURANI, M. A.; CHUN, S. C. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. **Microbiological Research**, v. 169, p. 83-98, 2014.

KUSS, A. V. et al. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético *in vitro* por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 1459-1465, 2007.

LODEWYCKX, C. et al. Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 21, p. 583-606, 2002.

MARRA, L. M. et al. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. **Plant Soil**, v. 357, p. 289-307, 2012.

MOREIRA, F. M. S. et al. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v.1, p.74-99, 2010.

NAUTIYAL, C. S. et al. Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. **FEMS Microbiology Letters**, v. 182, p. 291-296, 2000.

OLIVARES, F. L., REIS, V. M.; FAÇANHA, A. R. The role of endophytic diazotrophs in sugarcane root morphogenesis and development. In: FINAN, T M; O'BRIAN, M. R., LAYZELL, D. B; VESSEY, J. K.; NEWTON, W. (Eds), **Nitrogen fixation: global perspectives**. Oxon: CAB International, p. 476–477, 2002.

PANHWAR, Q. A. et al. Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from aerobic rice. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 2711-2719, 2012.

PEDRINHO, E. A. N. **Isolamento e caracterização de bactérias promotoras de crescimento em milho (*Zea mays* L.)**. 2009. 98 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

PEDRINHO, E. A. N. et al. Identificação e avaliação de rizobactérias isoladas de raízes de milho. **Bragantia**, v. 69, p. 905-911, 2010.

HARDOIM, P. R.; OVERBEEK, L. S.; ELSAS, J. D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, v. 10, p. 463-471, 2008.

RADWAN, T. S. D.; MOHAMED, Z. K.; REIS, V. M. Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, p.987-994, 2004.

RASHID, S.; CHARLES, T. C.; GLICK, B. R. Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes. **Applied Soil Ecology**, v. 61, p. 217-224, 2012.

RIBEIRO, C. M.; CARDOSO, E. J. B. N. Isolation, selection and characterization of root-associated growth promoting bacteria in Brazil Pine (*Araucaria angustifolia*).

Microbiological Research, v. 167, p. 69-78, 2012.

SALA, V. M. R.; FREITAS, S. S.; SILVEIRA, A. P. D. Interação entre fungos micorrízicos arbusculares e bactérias diazotróficas em trigo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 1593-1600, 2007.

SALA, V. M. R.; SILVEIRA, A. P. D.; CARDOSO, E. J. B. N. Bactérias diazotróficas associadas a plantas não-leguminosas. In: SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S (Eds.), **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Campinas: Instituto Agronômico, p. 97-116, 2007.

SALCEDO, L. D. P; PRIETO, C.; CORREA, M. F. Screening phosphate solubilizing actinobacteria isolated from the rhizosphere of wild plants from the Eastern Cordillera of the Colombian Andes, **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, p. 734-742, 2014.

SANTOS, J. S. et al. Inoculation and isolation of plant growth-promoting bacteria in maize grown in Vitória da Conquista, Bahia, Brazil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.39, p.78-85, 2015.

SARWAR, M.; KREMER, R. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria. **Plant and Soil**, v. 172, p. 261-269, 1995.

SOUZA, R. et al. The effect of plant growth-promoting rhizobacteria on the growth of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in southern Brazilian fields. **Plant Soil**, v. 366, p. 585-603. 2012.

TAIZ, L.; ZIEGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009, 819 p.

VIDEIRA, S. H. et al. Genetic diversity and plant growth promoting traits of diazotrophic bacteria isolated from two *Pennisetum purpureum* Schum. genotypes grown in the field. **Plant Soil**, v. 356, p.51-66, 2011.

CAPÍTULO IV - CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso indiscriminado de fertilizantes sintéticos tem gerado grande preocupação perante o meio ambiente, exigindo novas tecnologias necessárias para minimizar tais impactos, já que a produção de alimentos requer cada vez maior produtividade com menor área. Para tanto, a bioprospecção de cepas bacterianas úteis ao melhoramento deve ser ampliada.

Assim como em outras culturas, o isolamento apresentou grande diversidade de bactérias endofíticas em raízes de quinoa. A grande maioria delas, por sua vez, teve características importantes para a promoção de crescimento. Sabe-se que, a ocorrência de apenas uma característica de promoção, por vezes, é insuficiente para o desenvolvimento das plantas, porém, pode-se fazer uso das cepas que apresenta características de interesse ou até mesmo o uso combinado de cepas distintas.

Sugere-se, a continuidade deste trabalho, com a identificação dos isolados e testes a campo para comprovar a eficácia das bactérias isoladas, as quais apresentaram características benéficas à promoção de crescimento.