

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE AGRONOMIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**DISSERTAÇÃO**

**Seleção e Caracterização Polifásica de Bactérias do Gênero  
*Bacillus* com Atividade Antagônica as Raças 1, 2 e 3 de  
*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici***

**Francine Yuriko Otsuka Rocha**

**2015**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA  
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA - INSTITUTO DE AGRONOMIA**

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO POLIFÁSICA DE BACTÉRIAS DO  
GÊNERO *Bacillus* COM ATIVIDADE ANTAGÔNICA AS RAÇAS 1, 2 e 3  
DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici***

**FRANCINE YURIKO OTSUKA ROCHA**

*Sob a orientação do*

**PhD. José Ivo Baldani**

*e Co-orientação da Professora*

**DSc. Margarida Goréte Ferreira do Carmo**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências**, no curso de Pós-Graduação em Fitotecnia.

Seropédica, RJ  
Setembro de 2015

635.642

R672s

T

Rocha, Francine Yuriko Otsuka, 1991-  
Seleção e caracterização polifásica de bactérias do gênero *Bacillus* com atividade antagônica as raças 1, 2 e 3 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* / Francine Yuriko Otsuka Rocha. – 2015.  
75 f.: il.

Orientador: José Ivo Baldani.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, 2015.  
Bibliografia: f. 51-60.

1. Tomate – Doenças e pragas – Controle biológico - Teses. 2. Tomate - Microbiologia – Teses. 3. *Fusarium oxysporum* – Controle biológico – Teses. I. Baldani, José Ivo, 1953- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE AGRONOMIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**FRANCINE YURIKO OTSUKA ROCHA**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, área de Concentração em Fisiologia da Produção.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 29/09/2015

---

PhD. José Ivo Baldani (EMBRAPA Agrobiologia)  
(orientador)

---

Dr. Fábio Lopes Olivares (UENF)  
(Titular)

---

DSc. João Sebastião de Paula Araújo (UFRRJ)  
(Titular)

## DEDICATÓRIA

*À minha família, namorado e amigos que sempre me deram apoio e força durante o desenvolvimento desta pesquisa, dedico.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao orientador PhD. José Ivo Baldani pela prontidão em me orientar, pela paciência e ensinamentos.

A co-orientadora DSc. Margarida Goréte pela orientação neste trabalho.

A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela possibilidade de realização do valioso curso de pós-graduação.

A Embrapa Agrobiologia pela estrutura para execução da pesquisa.

A Capes pelo subsídio financeiro, por meio de bolsa de estudos.

A toda minha família, em especial a minha mãe e meu pai, pelo respeito, amor, carinho e incentivo.

Ao meu namorado Júlio, pelo incentivo, carinho, compreensão, auxílio e paciência.

A meu filho Bud por me fazer sorrir todos os dias, pelo amor e por me receber todos os dias com energia e alegria.

A todos do Laboratório de Genética e Bioquímica da Embrapa Agrobiologia, em especial a Paula, Cleiton, Valéria, Jéssica, Beth, Kátia, Carol Barra e Carol Nachi por terem tornado os dias no laboratório mais divertidos e a todos que me ajudaram nas coletas dos experimentos.

A todos do Laboratório de Epidemiologia e Patologia de Sementes da UFRRJ, em especial a Cris que estava sempre disposta a me ensinar e a ajudar nos experimentos.

A todos que direta ou indiretamente ajudaram no desenvolvimento e finalização deste trabalho.

A banca examinadora.

## RESUMO

ROCHA, Francine Yuriko Otsuka. **Seleção e caracterização polifásica de bactérias do gênero *Bacillus* com atividade antagônica as raças 1, 2 e 3 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici***. 2015. 75p Dissertação (Mestrado em Agronomia, Fitotecnia). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

A murcha-de-fusário causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* é uma doença de grande importância econômica para a cultura do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) devido as perdas que ocasiona na produção. O presente estudo teve como objetivo selecionar bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* que apresentam atividade antagônica para aplicação em áreas produtoras de tomate infestadas pelo fungo. Foram obtidos 193 isolados de bactérias de raízes e hastes de tomateiro. Foi realizado o sequenciamento completo da subunidade 16S RNAr de 32 isolados da coleção de trabalho, utilizando os iniciadores 27F e Amp2. Essas bactérias foram selecionadas aleatoriamente, sendo que 20 bactérias foram obtidas de tomateiro sadio. Os resultados mostraram uma alta similaridade das estirpes com as espécies do gênero *Bacillus*: *B. thuringiensis*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. toyonensis*, *B. stratosphericus*, além da espécie *Paenibacillus barcinonensis*. Testes para avaliar as características funcionais das estirpes bacterianas *in vitro* mostraram que 72% das estirpes possuem atividade proteolítica, 78% possuem atividade celulolítica, 48% solubilizam fosfato inorgânico, 42% solubilizam zinco e 40,8% são capazes de produzir indol. Testes de antagonismo realizados *in vitro* mostraram que algumas estirpes bacterianas retardaram ou reduziram o crescimento micelial das três raças do fungo quando submetidos ao método de ação direta (estrias paralelas). Com o objetivo de selecionar um genótipo de tomateiro sensível as três raças do fungo, foi instalado um experimento utilizando os genótipos Débora Plus, Santa Clara Miss Brasil, Perinha e Carolina. A variedade Perinha foi a mais suscetível as raças 1, 2 e 3 já que apresentou um maior percentual de colonização do fungo. A atividade antagônica das bactérias foi avaliada 15 dias após o transplântio das mudas de tomate da variedade Perinha para o substrato contaminado. Os resultados mostraram que a estirpe da espécie *B. stratosphericus* controlou cerca de 93,25% das plantas crescidas na presença da raça 1 do fungo. Já as espécies *B. megaterium* e *B. thuringiensis* controlaram 100% da doença das plantas de tomateiro cultivadas em substrato com a raça 2 e de 67,35% das plantas cultivadas em substrato com a raça 3 do fungo. Os resultados obtidos sugerem que algumas estirpes possuem potencial para controle de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 1, 2 e 3 e possuem atividades funcionais que podem contribuir para a melhoria do crescimento das plantas de tomateiro cultivadas em áreas infestadas com o fungo. Entretanto, estudos em campo são necessários para confirmar o papel dessas espécies de *Bacillus* na interação com plantas de tomateiro cultivadas na presença das raças 1, 2 e 3 da murcha de fusário.

**Palavras-chave:** Bactérias endofíticas. Controle biológico de murcha-de-fusário. Atividade funcional.

## ABSTRACT

ROCHA, Francine Yuriko Otsuka. **Selection and polyphasic characterization of the *Bacillus* bacteria with antagonistic activity to races 1, 2 and 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.** 2015. 75p Dissertation (Master Science in Agronomy, Fitotecnia). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

The fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* is a disease of economic importance to tomato crop (*Lycopersicon esculentum* Mill.) because of the losses caused in the production. This study aimed to select bacteria belonging to the genus *Bacillus* which have antagonistic activity to fungi present in tomato producing areas. It was obtained 193 bacterial isolates from tomato roots and stems. We performed the complete sequencing 16S rRNA subunit of 32 bacteria from the work collection using the 27F and Amp2 primers. These bacteria were randomly selected, and 20 bacteria were obtained from healthy tomato plants. The results showed a high similarity to species of the genus *Bacillus*: *B. thuringiensis*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. toyonensis*, *B. stratosphericus* and *Paenibacillus barcinonensis*. Evaluation of the functional characteristics of the bacterial strains showed that 72% possess proteolytic activity, 78% have cellulolytic activity, 48% are able to solubilize inorganic phosphate, 42% solubilize zinc oxide and 40.8% are able to produce indols. Antagonism tests carried out *in vitro* showed that some bacterial strains reduced the mycelial growth of the three races of the fungus when subjected to direct method (parallel streaks). An experiment was conducted using the genotypes Debora Plus, Santa Clara Miss Brazil, Perinha and Carolina in order to select a sensitive tomato genotype to the three fungal races. The Perinha variety was the most susceptible for races 1, 2 and 3 and presented the highest percentage of fungal colonization. Thus, this variety was used in a greenhouse experiments to evaluate the antagonistic role of the *Bacillus* strains against three fungal races. The antagonistic activity of bacteria was assessed 15 days after transplanting of the tomato seedlings to contaminated substrate. The results showed that the *B. stratosphericus* strain contributed to control at least 93.25% of the damage caused by race 1, strains from species *B. megaterium* and *B. thuringiensis* controlled 100% the damage caused by race 2 and at least 67.35% of the disease caused by the race 3 of the fungus. The results suggest that some strains have the potential to control race 1, 2 and 3 of the *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* and have functional activities that may contribute to improving the growth of tomato plants. However, field studies are needed to confirm the role of these *Bacillus* species during the interaction with tomato plants grown in soil contaminated with the race 1, 2 and 3 of the fusarium wilt.

**Key-words:** Endophytic bacteria. Biological control of fusarium wilt. Functional activity.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Fluxograma das diferentes etapas para o desenvolvimento das atividades de pesquisa descritas em material e métodos 10
- Figura 2. Exemplos de crescimento em meio de cultivo LB de bactérias isoladas da parte aérea de tomateiro originários das regiões produtoras 1, 2, 3, 4, 7 e F com diferentes quantidades de suspensão pasteurizada (25 µL, 50 µL e 100 µL). Em destaque pode-se observar colônias com morfotipo de *Bacillus* 19
- Figura 3. Exemplos de crescimento em meio de cultivo LB de bactérias isoladas do sistema radicular de tomateiro originários das regiões produtoras 1, 2, 3, 4, 7 e F com diferentes quantidades de suspensão pasteurizada (25 µL, 50 µL e 100 µL). Em destaque pode-se observar colônias com morfotipo de *Bacillus* 20
- Figura 4. Exemplos de bactérias Gram positivas e Gram variáveis analisadas através de metodologia de Coloração de Gram em microscópio ótico com objetiva de imersão, aumento de 100 X. (a) Bactérias Gram positivas (isolados - 16, 17, 18 e 24) e (b) Bactérias Gram variáveis (isolados 11, 21, 26 e 32) 21
- Figura 5. Métodos de preservação das bactérias endofíticas isoladas de raízes e hastes de tomateiro: (A) óleo mineral e (B) glicerol 10% 21
- Figura 6. Árvore filogenética baseada nas sequências 16S RNAr das estirpes bacterianas isoladas de tomateiro, calculada pelo algoritmo *Neighbor-Joining (NJ)*, fornecido pelo programa MEGA V6.0 25
- Figura 7. Exemplos de estirpes bacterianas submetidas ao teste de antagonismo *in vitro* para avaliação do potencial de produção de voláteis que inibem ou afetam o crescimento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Estirpes: PAL5 (controle), isolados 8, 10, 11, 20, 25, 32, 73 e 146 (isolados de tomateiro) e isolados 20C, 32C e 33C (isolados do líquido do apoplasto de plantas de cana-de-açúcar) 28
- Figura 8. Teste de antagonismo *in vitro* pelo método de estrias paralelas mostrando o crescimento micelial das raças 1, 2 e 3 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* na presença e ausência das estirpes selecionadas 31
- Figura 9. Estirpes bacterianas apresentando atividade celulolítica após tratamento das culturas crescidas em meio CMC com solução de iodine. (A) Estirpe S76; (B) Isolado 2; (C) Isolado 8; (D) Isolado 11; (E) Isolado 20; (F) Isolado 22; (G) Isolado 40; (H) Isolado 73; (I) Isolado 87; (J) Isolado 42 C. (a) Meio de cultura corado com iodine (parte em que não houve degradação de celulose); (b) Halo de degradação de celulose 32
- Figura 10. Concentração de auxina produzida pelas estirpes bacterianas mais promissoras pertencentes as espécies *B. megaterium* (isolado 18), *B. thuringiensis* (isolado 22) e *B. cereus* (isolados 154 e 178) crescida em meio NB (Nutrient Broth) com triptofano 32
- Figura 11. Estirpes bacterianas solubilizadoras de fosfato inorgânico em meio NBRIP contendo  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  como fonte de fósforo. (A) Estirpe PAL 5 (controle); (B) Isolado 11; (C) Isolado 25. (a) Halo de solubilização de fosfato inorgânico; (b) Colônia bacteriana 33
- Figura 12. Estirpes bacterianas solubilizadoras de zinco em meio NBRIP contendo ZnO como fonte de zinco. (A) Estirpe PAL 5 (controle); (B) Isolado 2; (C) Isolado 20. (a) Halo de

solubilização de zinco; (b) Colônia bacteriana

33

Figura 13. Exemplos de estirpes bacterianas com atividade proteolítica. (A) Estirpe PAL 5 (controle); (B) Estirpe S76; (C) Isolado 17; (D) Isolado 25; (E) Isolado 40; (F) Isolado 51; (G) Isolado 146; (H) Isolado 154; (I) Isolado 178; (J) Isolado 38 C. (a) Halo de degradação da proteína do leite; (b) Colônia bacteriana

35

Figura 14. Aspecto visual de plantas de tomateiro 15 dias após o transplântio para copos contendo substrato contaminado com as raças 1 e 3 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. (A) raça 3 (cultivar Perinha) (B) raça 3 (cultivar Carolina) (C) raça 1 (cultivar Perinha) (D) raça 1 (cultivar Carolina)

38

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Produção de tomate por região e por unidades de federação - junho/2015	3
Tabela 2. Similaridade filogenética das estirpes bacterinas isoladas do líquido do apolasto de plantas de cana-de-açúcar e a capacidade funcional de produção de auxina, solubilização de fosfato inorgânico e zinco avaliada <i>in vitro</i>	11
Tabela 3. Características das sementes usadas no ensaio de seleção de genótipos de tomateiro suscetíveis as raças de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	16
Tabela 4. Origem das bactérias endofíticas do gênero <i>Bacillus</i> utilizadas no experimento em casa de vegetação para avaliação do potencial de controle da raça 1 de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> quando inoculadas em tomateiro cultivados em substrato na presença do fungo	17
Tabela 5. Similaridade filogenética das estirpes bacterinas isoladas de tomateiros cultivados na região de Nova Friburgo, RJ	22
Tabela 6. Atividade antagônica das estirpes bacterianas as três raças de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> avaliada quatro dias após a inoculação (método de ação indireta)	26
Tabela 7. Atividade antagônica das estirpes bacterianas as três raças de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> avaliada seis dias após a inoculação (método de ação direta)	29
Tabela 8. Resultado sumarizado das características funcionais das estirpes bacterianas	36
Tabela 9. Extensão da colonização das raças 1, 2 e 3 de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> nos genótipos de tomateiro Carolina, Débora Plus, Perinha e Santa Clara Miss Brasil avaliadas 15 dias após o transplantio para substrato contaminado	38
Tabela 10. Análise do comprimento das hastes e porcentagem de infecção de plantas de tomateiro da variedade Perinha crescidas em substrato infestado com a raça 1 de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	40
Tabela 11. Características de biocontrole e promoção de crescimento das bactérias selecionadas no ensaio com a raça 1 de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> para os ensaios de antagonismo contra as raças 2 e 3 do fungo	42
Tabela 12. Análise do comprimento da haste e porcentagem de infecção de plantas de tomateiro da variedade Perinha crescidas em substrato infestado com a raça 2 de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	44
Tabela 13. Análise do comprimento das hastes e porcentagem de infecção de plantas de tomateiro da variedade Perinha crescidas em substrato infestado com a raça 3 de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	45
Tabela 14. Análise de acúmulo de massa fresca de tomateiros crescidos na presença e ausência das raças 1, 2 e 3 de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	46
Tabela 15. Bactérias selecionadas de acordo com características funcionais, promoção de crescimento e controle das raças de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	48

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>1</b>
2.1 Objetivo Geral	1
2.2 Objetivos Específicos	1
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>2</b>
3.1 Tomateiro ( <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.)	2
3.2 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	4
3.3 Murcha-de-fusário	5
3.4 Mecanismos de Defesa da Planta	6
3.5 Medidas de Controle de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	7
3.6 Microorganismos Antagônicos	8
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>9</b>
4.1 Microorganismos e Formas de Cultivo	11
4.1.1 <i>Bacillus</i> sp. originários do líquido do apoplasto de plantas de cana-de-açúcar	11
4.1.2 Bactérias originárias de tomateiro	11
4.1.2.1 Caracterização polifásica das bactérias isoladas de tomateiro e de plantas de cana-de-açúcar	12
a) Coloração de Gram	12
b) Extração de DNA e sequenciamento da subunidade 16S RNAr	12
c) Avaliação da capacidade antagônica das estirpes de <i>Bacillus</i> contra as raças de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	13
c.1) Ação indireta: produção de compostos voláteis	13
c.2) Ação direta: método de estrias paralelas	13
4.1.2.2 Atividades funcionais das estirpes bacterianas – <i>in vitro</i>	14
a) Atividade celulolítica	14
b) Produção de indol	14
c) Solubilização de fosfato e zinco <i>in vitro</i>	14
d) Atividade proteolítica	15
4.1.3 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	15
a) Crescimento dos fungos	15
b) Seleção de genótipos de tomateiro suscetíveis a <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	15
4.2 Inoculação de Substrato com as Raças de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	16
4.3 Seleção das Estirpes com Atividade Antagônica as Raças de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	16
4.4 Análise Estatística	19
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>19</b>
5.1 Isolamento de Bactérias de Tomateiro Cultivados em Áreas Produtoras de Nova Friburgo - RJ com Incidência de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	19
5.2 Identificação de Bactérias - Coloração de Gram e Preservação	20
5.3 Sequenciamento da Subunidade 16S RNAr dos Isolados Bacterianos Originários de Tomateiro	21
5.4 Resposta Antagônica das Estirpes Bacterianas as Raças 1, 2 e 3 de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> em Testes <i>in vitro</i>	26

5.4.1 Ação indireta: produção de compostos voláteis	26
5.4.2 Ação direta: método de estrias paralelas	28
5.5 Características Funcionais das Estirpes Bacterianas	31
5.5.1 Atividade celulolítica	31
5.5.2 Produção de compostos indólicos	32
5.5.3 Solubilização de fosfato inorgânico e zinco <i>in vitro</i>	33
5.5.4 Atividade proteolítica	34
5.6 Seleção de Genótipo de Tomateiro Suscetível a <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	37
5.7 Efeito da Inoculação de Bactérias em Tomateiro da Variedade Perinha e Avaliação da Proteção as Raças de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	39
<b>6 CONCLUSÕES</b>	<b>50</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>51</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>61</b>
<b>ANEXO I - Preservação de bactérias isoladas de tomateiro</b>	<b>61</b>
<b>a) Preservação em glicerol 10%</b>	<b>61</b>
<b>b) Preservação em óleo mineral</b>	<b>61</b>
<b>ANEXO II - Curva de calibração de auxina (<math>\mu\text{M.mL}^{-1}</math>)</b>	<b>62</b>
<b>ANEXO III - Avaliação das características funcionais das estirpes bacterianas</b>	<b>63</b>

## 1 INTRODUÇÃO □

O tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) é uma das olerícolas mais produzidas e comercializadas mundialmente, sendo uma cultura importante para a economia mundial. A tomaticultura no Brasil apresenta grande potencial de produção, mas está sujeita a diversos problemas fitossanitários ocasionados por fungos, bactérias, vírus e nematóides que acometem a produção. O fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* apresenta grande destaque entre os fitopatógenos causadores de doenças bióticas, causando a doença conhecida como murcha-de-fusário (SOUZA et al., 2010). Este fungo pode permanecer viável nas áreas de cultivo de tomateiro durante vários anos devido a produção de estruturas de resistência, os clamidósporos (MICHEREFF et al, 2005).

A espécie *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* é agrupada em três raças fisiológicas, sendo divididas de acordo com a habilidade em infectar e causar doença em cultivares diferenciadoras contendo diferentes *loci* de resistência (SOUZA et al., 2010). Já se sabe que no Brasil as raças fisiológicas 1 e 2 estão amplamente distribuídas e a raça 3 foi relatada nos estados do Espírito Santo (REIS et al., 2005) e Rio de Janeiro (REIS e BOITEUX, 2007).

O controle preventivo da murcha-de-fusário é uma das medidas de controle mais eficazes para que não haja comprometimento da produção, como por exemplo, uso de sementes e mudas saudáveis, limpeza eficaz de maquinários utilizados na área de cultivo, uso de água para irrigação isenta de inóculos etc. No entanto, quando o fungo já se encontra estabelecido na área de cultivo deve-se buscar alternativas que desfavoreçam o fitopatógeno e que evitam a disseminação de fontes de inóculo, como arranquio e eliminação de plantas infectadas, evitar movimentação de solo, proceder a limpeza de ferramentas e o manejo da fertilidade do solo. Outras alternativas são a rotação de culturas, a solarização, o uso de cultivares resistentes a raça mais predominante na área de cultivo e o controle biológico com microorganismos que apresentam atividade antagonista ao fungo.

Diversos estudos estão sendo realizados visando um controle efetivo de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* devido ao aparecimento de novas raças deste fitopatógeno nas regiões produtoras de tomate, o que dificulta seu controle utilizando métodos de controle como o controle químico, uso de cultivares resistentes e pelas grandes perdas que a murcha-de-fusário está causando para os produtores. Portanto, o controle do fitopatógeno através de agentes biológicos é uma estratégia que poderá contribuir para a redução das perdas na cultura do tomateiro.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Selecionar bactérias endofíticas do gênero *Bacillus* que promovam o desenvolvimento de tomateiro cultivados em substrato infestado com as raças 1, 2 e 3 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Isolar bactérias do gênero *Bacillus* presentes no interior dos tecidos de raízes e hastes de tomateiro cultivadas na região de Nova Friburgo (RJ), onde há ocorrência de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.
- Caracterizar taxonomicamente (16S RNAr) e funcionalmente (capacidade de produzir indol,

capacidade de produzir compostos voláteis, capacidade antagônica, capacidade de solubilizar fosfato e zinco *in vitro*, atividade celulolítica e proteolítica) as estirpes isoladas de tecidos internos de tomateiro.

- Avaliar a patogenicidade das raças 1, 2 e 3 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* sobre genótipos de tomateiro.

- Selecionar estirpes do gênero *Bacillus* com potencial de controle das três raças de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* em tomateiro cultivados em substrato contaminado com o fungo em condições de casa de vegetação.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA □

#### 3.1 Tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

O tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) é uma dicotiledônea pertencente a família Solanaceae. É uma planta perene de porte arbustivo, sendo cultivada anualmente, mas que pode permanecer na forma vegetativa durante anos (MAROTO, 1994). O tomateiro é uma planta autógama e possui flores hermafroditas ou perfeitas, com ovário súpero e regular. As flores ficam agrupadas em inflorescências racemosas e em um mesmo ramo floral é possível observar frutos e flores abertas (JARAMILLO, 2007).

O toamteiro pode apresentar crescimento determinado ou indeterminado. No primeiro caso os ramos florais apresentam período de floração limitado, plantas com esse tipo de crescimento são normalmente utilizadas quando os frutos produzidos tem como destino a indústria, a colheita é realizada uma vez. No caso de plantas com crescimento indeterminado a floração ocorre de forma contínua e o fruto é geralmente destinado ao consumo *in natura* (KINET e PEET, 1997).

O cultivo do tomateiro pode ser realizado de duas maneiras, dependendo do tipo de crescimento que a planta apresenta. O sistema tutorado é realizado no caso do cultivo de plantas que apresentam crescimento indeterminado ou semi-determinado. O não tutoramento é optado quando se usa cultivares de crescimento determinado (MAKISHIMA e MELO, 2004).

Esta olerícola teve como centro de origem a costa oeste da América do Sul, que compreende o Equador, Colômbia, Peru, Bolívia e norte do Chile. A domesticação do tomateiro ocorreu no México (ALVARENGA, 2004), se encontrando amplamente distribuída no mundo devido sua adaptação climática. O tomateiro se desenvolve bem em amplo espectro de latitude, tipos de solos, temperaturas e métodos de cultivo, sendo o ambiente quente, com boa iluminação e drenagem os mais adequados para o seu cultivo (ALVARENGA, 2004). O desenvolvimento do tomateiro é favorecido em regiões com altitude entre 500 e 900m, podendo ser plantado o ano inteiro, já em regiões com altitude inferior a 300m, o plantio deve proceder preferencialmente no inverno (SILVA et al., 2007).

O tomateiro pode tolerar temperaturas entre 10 e 34°C, mas cabe ressaltar que temperaturas próximas aos limites inferior e superior podem levar a problemas na produção de pólen e no desenvolvimento da planta, como crescimento reduzido, coloração amarelada de frutos e formação de frutos ocos. O tomateiro é exigente em água, mas a água em excesso e umidade relativa alta favorece o desenvolvimento de microorganismos causadores de doenças nas plantas e frutos, além de limitar o crescimento do sistema radicular em solos mal drenados, o que torna a planta menos eficiente na absorção de nutrientes (EMBRAPA Hortaliças, 2006).

Segundo dados apresentados pela Organização das Nações Unidas para a Agricultura e

Alimentação - FAOStat (2013), o maior produtor mundial de tomate é a China, seguido da Índia, Estados Unidos, Turquia, Egito e o Brasil em nono lugar. Em estudo realizado no Levantamento Sistemático de Produção Agrícola pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2015) o Brasil apresentou em junho de 2015 uma produção de aproximadamente 3,7 milhões de toneladas em 57 mil hectares.

Dentre as regiões brasileiras, as que apresentaram maior destaque na produção de tomate até junho de 2015 foram a região Sudeste, que é a região mais produtora de tomate do Brasil contribuindo com produção de 1,56 milhões de toneladas e em segundo lugar a região Centro-Oeste, que também colabora com produção de tomate de 975,9 mil toneladas (Tabela 1). Os estados brasileiros que mais se destacaram na produção de tomate na safra de 2015 foram Goiás, com 934,8 mil de toneladas, Minas Gerais com 656,1 mil toneladas e São Paulo com 568,8 mil toneladas (Tabela 1).

Tabela 1. Produção de tomate por região e por unidades de federação - junho/2015

Região	Estado	Total por UF (ton)	Total por Região (ton)
Norte	Roraima	3 779	13 485
	Pará	9 706	
Nordeste	Maranhão	4 330	512 893
	Piauí	2 726	
	Ceará	128 590	
	Rio Grande do Norte	5 226	
	Paraíba	17 200	
	Pernambuco	94 441	
	Alagoas	9 532	
	Sergipe	2 565	
	Bahia	248 283	
	Sudeste	Minas Gerais	
Espírito Santo		155 208	
Rio de Janeiro		188 471	
São Paulo		568 866	
Sul	Paraná	208 723	610 628
	Santa Catarina	180 054	
	Rio Grande do Sul	221 851	
Centro-Oeste	Mato Grosso do Sul	2 870	975 974
	Mato Grosso	9 259	
	Goiás	934 850	
	Distrito Federal	28 995	

Fonte: IBGE. Levantamento Sistemático da produção Agrícola, junho/2015

De acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística o Rio de Janeiro é o sétimo maior produtor de tomate do Brasil (Tabela 1). O município de São José de Ubá foi o maior produtor de tomate do Estado do Rio de Janeiro como mostra levantamento realizado em 2009 pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, citado por Pesagro-Rio (2012), seguido



do município de Cambuci, Paty do Alferes, Itaperuna, Bom Jardim, Santo Antônio de Pádua, Nova Friburgo, Sumidouro, São Sebastião do Alto e São José do Vale do Rio Preto. A produção de tomate no Estado do Rio de Janeiro tem como destino o mercado para consumo *in natura*. (PESAGRO-Rio, 2012).

### 3.2 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* é um fungo pertencente ao filo Ascomycota, classe Ascomycetes e ordem Hypocreales. Os fungos pertencentes à espécie *F. oxysporum* apresentam morfologia similares, sendo o *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* separado devido as suas adaptações fisiológicas e patológicas ao tomateiro (CORRELL, 1991). Este fungo coloniza o solo e ocorre na rizosfera de muitas espécies de plantas (OLIVAIN e ALABOUVETTE, 1999), podendo vir a induzir a murcha vascular, ou também conhecida murcha-de-fusário, em tomateiro.

O *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* apresenta micélio septado e as colônias são pouco coloridas no início do desenvolvimento, ficando amarela pálida com a idade, mas sob determinadas condições, adquire coloração rosa pálida ou púrpura (VALE et al., 2000)

Esta espécie de fungo produz quatro tipos de inóculos, o micélio, os microconídios, os macroconídios e os clamidósporos (MICHEREFF et al, 2005). A estrutura de resistência de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* são os clamidósporos. Estas estruturas apresentam paredes espessas, duplas e rugosas, formato globoso e podem ser formadas isoladamente ou nas extremidades de conidióforos ou intercalados nas hifas ou nos macroconídios (LESLIE e SUMMERELL, 2006). Os clamidósporos de *F. oxysporum* podem ter uma ou duas células (KUROZAWA e PAVAN, 2005), e são resultantes da transformação das hifas (VALE et al., 2000). O fungo pode permanecer viável no solo por anos devido a produção de clamidósporos (REIS e LOPES, 2007).

O processo de entrada do fungo na planta e infecção ocorre quando os clamidósporos germinam sobre as raízes da planta hospedeira e o tubo germinativo penetra a superfície do hospedeiro. A entrada do patógeno na planta também pode ocorrer em consequência de ferimentos e através de aberturas naturais (NELSON, 1981). No tecido vegetal, as hifas se aderem às células epidermais e corticais e estas são penetradas por hifas constrictas que causam degradação local da parede celular (BECKMAN, 1987). No entanto, a entrada do patógeno na planta não significa que a mesma será infectada, este processo depende dos mecanismos de resistência do hospedeiro e de ataque do fungo (TOYODA et al., 1988). As hifas instaladas no interior da planta hospedeira crescem seguindo os vasos do xilema, ocorrendo bloqueio dos vasos e limitando a passagem de água e minerais para a parte aérea levando ao sintoma de murcha (BECKMAN, 1987).

O fungo *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* é agrupado em três raças fisiológicas, denominadas raças 1, 2 e 3 sendo esta classificação dependente das habilidades que o fungo apresenta em infectar e causar doença em uma série de cultivares de tomate que possuem genes em diferentes *loci* de resistência (SOUZA et al., 2010). O conhecimento dessa variabilidade dentro da espécie é fundamental para adoção de medidas de controle e melhoramento genético (JULIATTI et al., 1994; SANTOS, 1996). Segundo Vale et al. (2004), todas as raças fisiológicas do patógeno já se encontram estabelecidas no Brasil.

O desenvolvimento do fungo é favorecido em solos ácidos, pobres, com deficiência de cálcio e deficiência hídrica (KUROZAWA e PAVAN, 2005). Segundo Lopes et al. (2003), solos com alta infestação de nematóides também podem contribuir para o aumento da severidade da doença em decorrência dos ferimentos causados nas raízes, que servem de porta de entrada para o patógeno.

Os fungos de solo são em geral mais difíceis de serem controlados e por isso o manejo

pelo princípio da exclusão deve ser considerado, a fim de evitar o aparecimento do fungo em áreas que ainda não foram relatados problemas fitossanitários (COSTA et al., 2007).

Alguns autores relatam que a patogenicidade de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* em tomateiro está associada a produção de uma toxina denominada ácido fusárico (GAUMANN, 1957). Segundo Tamari e Kaji (1954), esta toxina aumenta a permeabilidade das membranas do hospedeiro suscetível, resultando em alterações no equilíbrio iônico e perda de eletrólitos pelas células (TAMARI e KAJI, 1954). Já se sabe que algumas bactérias, como *Cladosporium werneckii*, *Pseudomonas cepacia* e *P. solanacearum*, são capazes de hidrolisar o ácido fusárico produzido por fungos do gênero *Fusarium*, evitando assim os danos que este fungo pode ocasionar, permitindo a ativação de mecanismos de defesa (GLICK e BASHAN, 1997).

### 3.3 Murcha-de-fusário

A murcha-de-fusário é uma doença vascular monocíclica, causada pelo fungo *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, que limita a produção de tomate, por ocasionar morte das plantas quando em estado avançado. Segundo Deslandes (1940), a primeira constatação da murcha-de-fusário em tomateiro no Brasil ocorreu em 1938, no município de Pesqueira, Sertão de Pernambuco. Hoje esta doença está amplamente distribuída nas áreas produtoras de tomate. (REIS et al., 2005). Em geral, as murchas vasculares são doenças em que o sistema vascular fica obstruído, limitando a translocação de água no interior da planta, o que leva aos sintomas de murcha e conseqüentemente a morte da planta (MICHEREFF et al., 2005). Segundo Wheeler e Rush (2001), a obstrução do sistema vascular da planta, impedindo o transporte de água via xilema, se deve ao crescimento do fungo no interior do sistema vascular e a produção de toxinas pelo fungo.

Os sintomas de murcha-de-fusário podem ser observados em plântulas. No entanto, são mais frequentes após o início da floração (WHEELER e RUSH, 2001; KUROZAWA e PAVAN, 2005) e levam de três a cinco semanas para progredir até o ápice do tomateiro (MICHEREFF et al., 2005).

Após o estabelecimento da doença na planta, os sintomas decorrentes da infecção do fungo são amarelecimento das folhas a partir das mais velhas, seguido de murcha da planta (LOPES & SANTOS, 1994). No início da manifestação da doença, a murcha ocorre nos períodos mais quentes do dia, até que este processo se torna irreversível com o progresso da doença (VALE et al., 2000). Os sintomas de murcha aparecem inicialmente nas folhas basais, que perdem turgidez e ficam amareladas, apresentando crestamento do limbo e caindo por consequência. No entanto, os sintomas podem se manifestar de formas diferentes quando as plantas são cultivadas no viveiro ou no campo. No caso de plantas de viveiro, ocorre o clareamento das nervuras das folhas e curvamento dos pecíolos, e em plantas do campo ocorre o amarelecimento das folhas no início de frutificação (VALE et al., 2004). Segundo Nelson (1981), o escurecimento de vasos condutores, observado a partir do corte transversal de raízes e/ou caules doentes, é um indicativo da presença do patógeno na planta. O escurecimento ocorre devido a necrose dos tecidos que compõem o sistema vascular da planta e por este motivo o crescimento da planta infectada pode ser mais retardado do que de uma planta sadia.

Segundo Kurozawa e Pavan (2005), temperaturas entre 21 e 33°C favorecem o desenvolvimento da doença, sendo o ótimo desenvolvimento em temperatura de 28°C e mais severa e rápida quando em temperaturas entre 27 e 30°C (KUROZAWA e PAVAN, 2005). A presença de nematóides, como por exemplo, *Meloidogyne* spp. pode tornar a doença ainda mais severa (WHEELER e RUSH, 2001).

### 3.4 Mecanismos de Defesa da Planta

A todo o momento as plantas estão sujeitas a ataques de fungos, nematóides, vírus, insetos, ácaros, bactérias e outros organismos. Desta forma, os vegetais precisam dispor de algumas formas de proteção, como por exemplo, a produção de metabólitos secundários. Esses metabólitos não apresentam função direta no crescimento e no desenvolvimento do vegetal, mas são extremamente importantes no mecanismo de defesa das plantas e são divididos em três grupos principais de metabólitos secundários, os terpenos, os compostos fenólicos e os compostos nitrogenados (SANTARÉM, 2004).

Segundo Santarém (2004), os terpenos constituem o maior grupo de compostos secundários e são, em geral, insolúveis em água e sintetizados a partir da acetil Co-enzima A ou de intermediários glicolíticos. Os terpenos são produtos tóxicos contra insetos e alguns mamíferos herbívoros. Exemplos de terpenos são os piretróides, óleos essenciais, limonóides, saponinas, fitoecdisonas e os cadernolídeos. Os compostos fenólicos agem como compostos de defesa contra herbívoros e patógenos. A maioria dos compostos fenólicos é derivada da fenilalanina, produto da rota do ácido chiquímico. Exemplos de compostos fenólicos são flavonóides, lignina, antocianina, taninos e isoflavonóides. Alguns compostos nitrogenados também fazem parte do mecanismo de defesa dos vegetais contra herbivoria como os alcalóides, os glicosídeos cianogênicos, os glucosinolatos e os aminoácidos não-protéicos (SANTARÉM, 2004).

Os metabólitos secundários são em geral produzidos após o ataque do inseto ou após a infecção provocada pelos patógenos. Segundo Santarém (2004), quando os tomateiros são atacadas por insetos herbívoros podem produzir algumas proteínas que interferem no sistema digestivo do inseto, sendo os inibidores de proteases as proteínas mais conhecidas produzidas pelas plantas. No momento em que a planta é atacada pelo inseto é iniciada a síntese de prosistemina na região da lesão causada pelo inseto. O processamento de prosistemina produz a sistemina, que é um peptídeo de ação hormonal. As células danificadas liberam a sistemina no apoplasto, que é transportada via floema e se liga a um receptor na membrana plasmática, desencadeando a biossíntese de ácido jasmônico. Esse hormônio ativa genes que codificam os inibidores de proteases, ocorrendo bloqueio da ação de enzimas proteolíticas, como tripsina e quimotripsina, o que impede a digestão das proteínas ingeridas pelo inseto. A não digestão de proteínas no trato digestivo do inseto faz com que as taxas de crescimento e desenvolvimento do inseto sejam reduzidas (SANTARÉM, 2004). O ataque do inseto ao desencadear essa rota de sinalização e conseqüentemente de produção de inibidores de proteases faz com que toda a planta, assim como plantas próximas a planta atacada, apresente esse mecanismo de defesa. Isso ocorre porque o ácido jasmônico é um composto volátil, sendo disperso para outras plantas. Outro mecanismo de defesa das plantas é a resposta de hipersensibilidade, em que as células próximas ao local de infecção morrem (SILVA et al., 2006), impedindo que o microorganismo se desenvolva devido a falta de nutrientes. A resposta de hipersensibilidade pode levar a produção de espécies reativas de oxigênio que sintetizam compostos tóxicos devido a redução de oxigênio. No entanto, esse mecanismo de defesa é eficaz apenas contra agentes patogênicos biotróficos, ou seja, aqueles que dependem de células hospedeiras vivas para a sobrevivência (RICHAEL e GILCHRIST, 1999).

Alguns vegetais produzem fitoalexinas próximo ao local de infecção. Após o ataque do microorganismo, ocorre a transdução de RNA em enzimas para a síntese de fitoalexinas. As respostas da planta ao ataque do patógeno ocorrem após o reconhecimento de substâncias liberadas pelos patógenos, como por exemplo, peptídeos, proteínas, esteróis, fragmentos de polissacarídeos presentes na parede celular do fitopatógeno, membrana externa, secreções etc.

Essas substâncias são chamadas de eliciadores e o reconhecimento dos mesmos pelas plantas, através dos sítios de reconhecimento, ativam rotas de sinalização levando as diferentes formas de defesa da planta. Após a ativação dos genes de resistência pode ocorrer mudança transitória na permeabilidade da membrana plasmática, ou seja, ocorre estímulo para entrada de íons  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{H}^+$  e saída de  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$ . A entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  nas células ativa as reações oxidativas, agindo diretamente na defesa da planta, além de outros compostos como proteínas quinases, ácido jasmônico e ácido salicílico desencadeando mecanismo de resistência sistêmica adquirida (SANTARÉM, 2004).

Segundo Vera-Estrella et al. (1994), o mecanismo de resposta a agentes patogênicos em tomateiro envolve a ativação de fosfatases que desfosforilam resíduos da membrana plasmática (ativando  $\text{H}^+ \text{-ATPase}$ ), que é uma das etapas que ocorrem na sinalização para defesa da planta.

### **3.5 Medidas de Controle de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici***

O controle de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* é difícil, visto que este fitopatógeno habita o solo e penetra na planta através do sistema radicular. A dificuldade de controle deste fitopatógeno também está relacionada à produção de clamidósporos (estruturas de resistência) que permite a viabilidade do fungo no solo durante anos. Em áreas onde não foi relatado ocorrência da murcha-de-fusário, o mais importante é impedir a entrada do fitopatógeno na área de cultivo, baseando-se no manejo pelo princípio da exclusão (COSTA et al., 2007). Desta forma devem ser adotadas medidas preventivas, como o uso de sementes e mudas sadias e livres de qualquer fonte de inóculo, proceder limpeza adequada dos maquinários que serão utilizados na área de cultivo, limpeza de ferramentas, botas e roupas utilizadas pelos trabalhadores, utilizar água de irrigação livre de fonte de inóculo e que não tenham como origem áreas contaminadas pelo fungo etc. A partir do momento que o fitopatógeno já se encontra estabelecido na área de cultivo, devem ser adotadas medidas que irão desfavorecer a disseminação do fungo na área, como por exemplo, evitar a movimentação do solo, realizar o arranquio de plantas infectadas e erradicação das mesmas através da queima. No entanto, para que este método de controle se torne eficaz é preciso que todos os produtores de tomate tomem esta medida de maneira conjunta (VALE et al., 2004). Além dessas medidas de controle, as medidas culturais de manejo da fertilidade do solo influenciam muito no desenvolvimento do fitopatógeno no solo. A prática de calagem e disponibilização de matéria orgânica no solo desfavorecem o desenvolvimento do fitopatógeno (BECKMAN, 1987).

O controle através da solarização é bastante eficaz para a maioria dos fitopatógenos. Porém, estudo realizado por Wong et al., (2011) mostrou que o controle do fungo *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* não foi efetivo empregando a solarização na cultura do tomateiro, visto que a temperatura atingida pela solarização não afetou a sobrevivência do fungo (WONG et al., 2011). A rotação de culturas (CURL, 1963) também pode ser empregada para controle da doença. No entanto, o período de rotação deve ser longo já que o fungo permanece viável por muitos anos no solo através de estruturas de resistência.

Outra alternativa seria o uso de cultivares resistentes a raça do fitopatógeno predominante na área de cultivo (NASCIMENTO et al., 1995; REIS et al., 2005), porém o surgimento de novas raças do patógeno dificultam o processo de melhoramento de cultivares. O controle químico com fungicidas também pode ser adotado (GOULART, 2002), mas ainda é inviável do ponto de vista econômico (BLANCARD, 1996) além de causar danos ambientais, ao homem e aos animais (GHINI, 2001).

Como as medidas hoje conhecidas para controle deste fitopatógeno ainda não são totalmente eficazes, diversos estudos tem sido realizados visando o controle biológico como uma forma alternativa, eficaz e viável no controle de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. No entanto, cabe

ressaltar que todas as medidas de controle devem estar envolvidas em um programa de manejo integrado para um controle mais efetivo, visando a exclusão, erradicação e proteção da área de cultivo (KUROZAWA e PAVAN, 2005).

### 3.6 Microorganismos Antagônicos

O uso de bactérias do gênero *Bacillus* que possuem atividade antagônica ao fungo causador da murcha-de-fusário tem se mostrado uma maneira eficaz no controle desta doença.

Diversas espécies de *Bacillus* são antagonistas de fungos fitopatogênicos podendo ser usadas em programas de controle biológico (ANGONESE et al., 2009; SCHISLER et al., 2004; WILHELM et al., 1998, WULFF et al., 2002). Segundo Petras e Casida (1985), bactérias do gênero *Bacillus* conseguem permanecer viáveis mesmo quando estocadas por longos períodos. Desta forma, apresentam grande potencial de uso como agentes de biocontrole.

Como descrito por Nascimento (2009) e Rocha e Moura (2013), bactérias do gênero *Bacillus*, como *B. cereus*, *B. polymyxa*, *B. lentus*, *Bacillus* sp. e *B. pumilus*, mostraram-se eficazes no controle de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, promovendo inibição do crescimento micelial do fitopatógeno. Já os autores Prashar et al. (2013), relataram que a bactéria *Bacillus subtilis*, isolada da rizosfera de plantas saudáveis de tomateiro, apresentou metabolismo antagônico a *F. oxysporum* em testes *in vitro*, devido a produção de metabólitos antifúngicos, cianeto de hidrogênio e amônia. Isolados de *Streptomyces* sp. também reduziram a incidência de murcha-de-fusário, causada por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (ROCHA e MOURA, 2013).

Alguns autores relataram o uso de microorganismos antagônicos a diversos patógenos de doenças de importância econômica, como Shiomi (2007) observou a atividade antagônica de *B. subtilis*, *B. lentimorbus* e *Streptomyces* sp. aos fungos *Phytium aphanidermatum*, *F. moniliforme*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, e o fungo foliar *Exerohilum turcicum*. Rocha e Moura (2013) observaram que o isolado de *Pseudomonas* sp. foi capaz de reduzir incidência de murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* enquanto que Bacon et al., (2001) relataram que a bactéria endofítica *B. subtilis* foi capaz de reduzir os níveis de micotoxinas acumuladas nas sementes de milho por *F. moniliforme*. Segundo Kupper et al. (2003), isolados de *Bacillus* sp. inibiram o crescimento de *Colletotrichum acutatum* em condições de laboratório e nas condições de campo. Em batata-doce (*Beta vulgaris* L.) e tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.), a aplicação de *B. subtilis* reduziu a incidência de *R. solani*, *Pythium* sp. e outros patógenos, além disso estimulou a germinação, o crescimento e a produtividade das plantas (BALDOTTO et al., 2010; RAUPACH e KLOEPPER, 1998).

Asaka e Shoda (1996) demonstraram que *B. subtilis* apresenta atividade *in vitro* contra diferentes patógenos de plantas através da produção de antibióticos denominados iturina A e surfactina, que são capazes de inibir o crescimento micelial de fungos. Assim como *B. subtilis*, o *B. cereus* excreta a quitinase. A aplicação deste microorganismo no solo protegeu plântulas de algodão contra doenças causadas por *Rhizoctonia solani* (PLEBAN et al., 1997). Zachow, Grosch e Berg (2011), também identificaram microorganismos com forte potencial antagônico a *Rhizoctonia solani*. Esses microorganismos pertencem ao gênero *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Stenotrophomonas* e podem ser utilizados no controle biológico de *R. solani* quando incorporado no solo ou aplicado a planta infectada pelo fungo.

A introdução de bactérias antagônicas no ambiente agrícola pode induzir a supressividade de fitopatógenos causadores de doenças, prevenindo assim seu estabelecimento. Solos com grande diversidade biológica apresentam maior capacidade de supressão de patógenos. Segundo Bettiol et al. (2009), as bactérias mais estudadas em relação a supressividade são as bactérias do gênero *Pseudomonas* e *Bacillus*, sendo as bactérias *B. pumilus* e *B. subtilis* destaque na

capacidade de inibição de bactérias e fungos fitopatogênicos. A supressividade ocorre por meio de mecanismos envolvidos no controle biológico como antibiose, parasitismo, competição, predação e indução de resistência do hospedeiro (BETTIOL et al., 2009). Desta forma, é importante estimular o desenvolvimento e a multiplicação dos microorganismos antagônicos nos ambientes agrícolas, através da adoção de práticas de manejo que irão favorecer o desenvolvimento dos antagonistas, a fim de suprimir o desenvolvimento de fitopatógenos na área de cultivo.

#### **4 MATERIAL E MÉTODOS**

A figura 1 apresenta o fluxograma referente as metodologias utilizadas para o desenvolvimento das diferentes etapas das pesquisas realizadas no presente estudo. Como pode ser visto, os estudos envolvem uma parte de bactérias previamente isoladas do líquido do apoplasto de cana-de-açúcar e outra parte de novas bactérias obtidas de raízes e hastes de tomateiro cultivados na região de Nova Friburgo, RJ. Além disso, mostra os testes de sensibilidade de variedades de tomate as raças 1, 2 e 3 de fusário. As etapas do fluxograma conduzem para a seleção final de estirpes (identificadas taxonomicamente) capazes de inibir ou reduzir o ataque dos fungos.

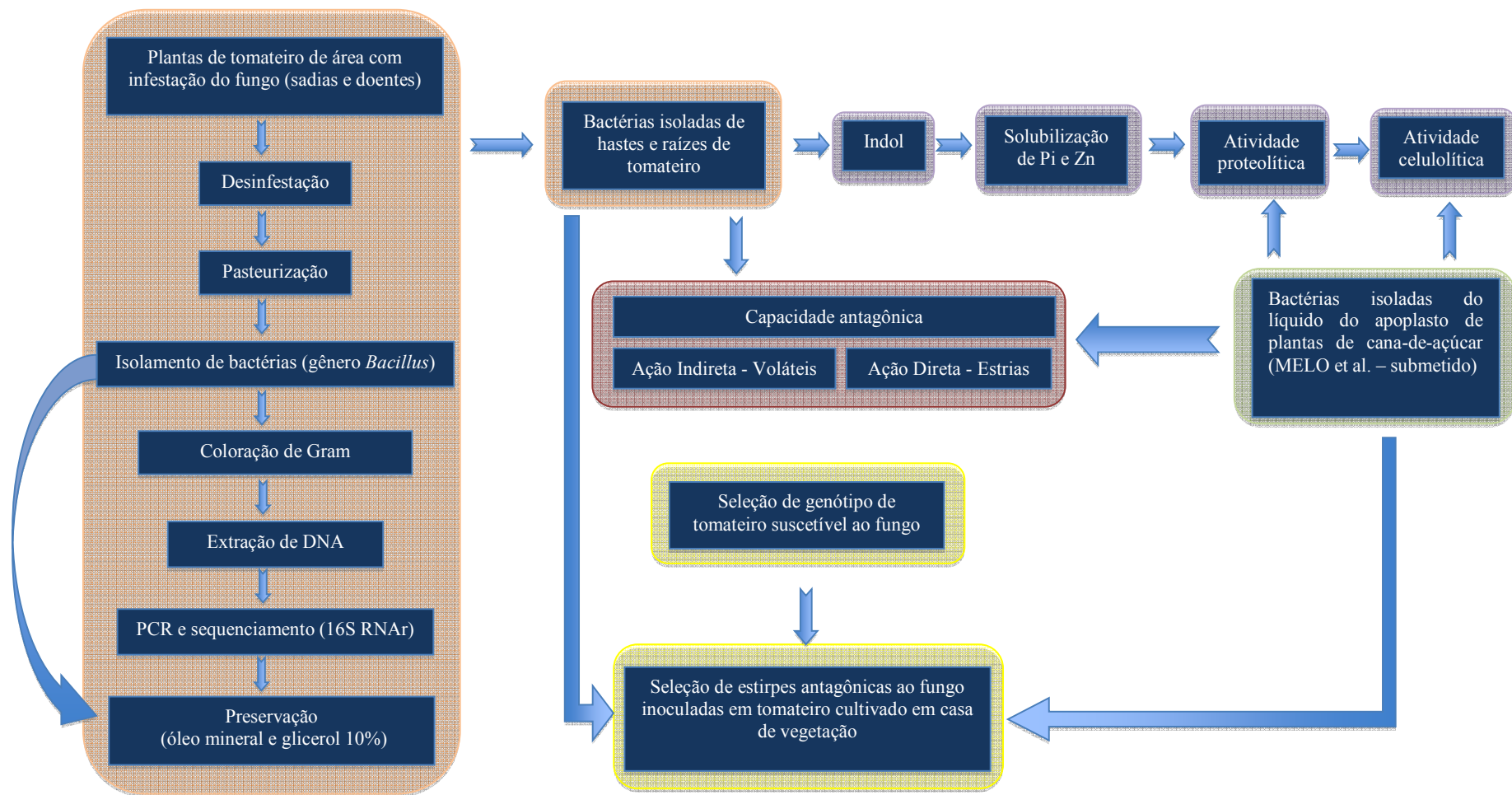


Figura 1. Fluxograma das diferentes etapas para o desenvolvimento das atividades de pesquisa descritas em material e métodos.

## 4.1 Microorganismos e Formas de Cultivo

### 4.1.1 *Bacillus* sp. originários do líquido do apoplasto de plantas de cana-de-açúcar

Parte das estirpes bacterianas utilizadas nos ensaios foram isoladas do líquido do apoplasto de plantas de cana-de-açúcar conforme protocolo estabelecido por DONG et al., (1994). Este isolamento foi realizado no laboratório de Genética e Bioquímica da Embrapa Agrobiologia a partir de variedades de cana-de-açúcar cultivadas em 7 localidades do Brasil (MELO et al., submetido). Em estudos prévios foi observado que algumas das bactérias isoladas do líquido do apoplasto de plantas de cana-de-açúcar apresentaram potencial de produção de indols e de solubilização de fósforo e zinco *in vitro*. Estas estirpes endofíticas foram identificadas taxonomicamente como *Bacillus* e pré-testadas em tomateiro (Tabela 2).

Tabela 2. Similaridade filogenética das estirpes bacterianas isoladas do líquido do apoplasto de plantas de cana-de-açúcar e a capacidade funcional de produção de auxina, solubilização de fosfato inorgânico e zinco avaliada *in vitro*.

Número Isolado	Similaridade filogenética baseada na sequência parcial ou total da subunidade 16S rRNA	Indols <sup>a</sup>	Pi <sup>b</sup>	Zn <sup>c</sup>
3 C	Não determinada	+	+	+
8 C	<i>Bacillus megaterium</i>	+	-	-
12 C	<i>Bacillus cereus</i>	+	-	+
20 C	<i>Bacillus megaterium</i>	+	-	+
21 C	<i>Bacillus megaterium</i>	+	-	-
22 C	<i>Bacillus megaterium</i>	+	-	+
23 C	<i>Bacillus megaterium</i>	+	-	+
27 C	<i>Bacillus megaterium</i>	+	-	+
28 C	<i>Bacillus megaterium</i>	+	-	+
32 C	<i>Bacillus megaterium</i>	+	-	+
33 C	<i>Bacillus megaterium</i>	+	+	+
36 C	<i>Bacillus megaterium</i>	+	+	+
38 C	<i>Bacillus pumilus</i>	-	-	+
42 C	<i>Paenibacillus taichungensis</i>	+	+	+
48 C	<i>Bacillus subtilis</i>	+	-	+

<sup>a</sup> Produção de indols

<sup>b</sup> Solubilização de fosfato inorgânico (Pi)

<sup>c</sup> Solubilização de zinco

Sinais: (+) fenótipo positivo e (-) fenótipo negativo.

### 4.1.2 Bactérias originárias de tomateiro

Estirpes bacterianas pertencentes ao gênero *Bacillus* foram isoladas das raízes e hastes de tomateiro, produzidas em áreas com presença de *Fusarium* sp. no município de Nova Friburgo (RJ). Para o isolamento destas bactérias foi realizada a esterilização das plantas de tomateiro de acordo com protocolo de Döbereiner et al. (1995) que consiste em imergir as raízes e hastes das plantas em solução de cloramina-T a 1% (C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>ClNNaO<sub>2</sub>S<sub>3</sub>H<sub>2</sub>O) por um período de 15 minutos. As raízes e as hastes foram retiradas da solução de cloramina-T e colocadas em frascos contendo água destilada por 1/3 do tempo da exposição a cloramina-T, esta etapa foi realizada duas vezes. Em seguida, foram transferidas para frasco contendo solução tampão fosfato 0,05 M (pH 7,0) e



lavadas em água destilada estéril. Todos os procedimentos de desinfestação foram realizados em capela para evitar possíveis contaminações e a última água utilizada para lavagem foi plaqueada em placas de Petri contendo meio de cultivo para verificar se a esterilização foi satisfatória. A desinfestação da parte aérea e das raízes foi realizada separadamente. Após a desinfestação, o material vegetal foi macerado com um volume de água destilada e 1,0 mL dessa suspensão passou por um processo de pasteurização seguindo protocolo da World Health Organization (1999), onde foi submetido a temperatura de 80°C durante 12 minutos seguido de incubação no gelo por cinco minutos. Aliquotas de 100 µL, 50 µL e 25 µL foram semeadas em placas de Petri contendo meio LB (Luria Bertani Broth - 1 g de triptona, 0,5 g de extrato de levedura, 1 g de NaCl e 15 g.L<sup>-1</sup> de ágar adicionados a 1000 mL de água destilada, pH 7,0) (SAMBROOK et al., 1989) e incubadas a 30°C por 16 horas. As bactérias com características morfológicas semelhantes a bactérias do gênero *Bacillus*, tais como colônias brancas, grandes, com bordas irregulares, opaco e aveludado (LOGAN e De VOS, 2009) foram isoladas e preservadas em glicerol e em óleo mineral (ANEXO I).

#### **4.1.2.1 Caracterização polifásica das bactérias isoladas de tomateiro e de plantas de cana-de-açúcar**

##### **a) Coloração de Gram**

O teste de coloração de Gram foi realizado com o objetivo de confirmar se as bactérias isoladas são Gram-positivas ou Gram-negativas. Inicialmente as bactérias foram crescidas em placas de Petri contendo meio BHI (Becton, Dickinson and Company®, USA, cat. # 237500 - <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=9103>) sólido por ser um meio bastante rico e incubadas a temperatura de 30°C por 16 horas. Foi feito o esfregaço na lâmina de vidro e para tal foram colocadas duas gotas de água sobre a lâmina e com o auxílio da alça de platina um pouco da cultura, que foi misturada a água, deixando o esfregaço bem homogêneo. Após a evaporação da água, o esfregaço foi fixado na lâmina passando a mesma 3 vezes sobre a chama do Bico de Bunsen. O esfregaço foi colorido colocando 1 mL das soluções: 1º: Solução corante de cristal violeta por 1 minuto; 2º: Solução de lugol por 1 minuto; 3º: Solução de etanol/acetona (o esfregaço foi coberto com a solução e esta foi lavada com água destilada); 4º: Solução corante de safranina por 30 segundos (Entre a aplicação de cada solução a lâmina foi lavada com água destilada com ajuda de um pissete). Após a última lavagem o esfregaço foi seco com auxílio de papel. Para observação do esfregaço em microscópio ótico (objetiva de imersão, aumento 100X) este foi coberto com uma gota de óleo de imersão (GRAM, 1884). Para confirmar o fenótipo variável de GRAM, algumas estirpes foram amostradas em intervalos de 12 horas durante o período de 72 horas de crescimento em meio BHI e analisadas conforme descrito acima.

##### **b) Extração de DNA e sequenciamento da subunidade 16S RNAr**

Para proceder a extração do DNA das bactérias isoladas de tomateiro foi utilizado um kit para extração de DNA genômico (Wizard® Genomic DNA Purification kit, da marca Promega), seguindo protocolo descrito no manual do fabricante. Após a extração, o DNA das bactérias foram quantificados utilizando o Qubit® (Qubit® Fluorometric Quantitation) e a concentração foi ajustada para 50 ng de DNA.µL<sup>-1</sup>. A região 16S RNAr foi amplificada por meio de reações em cadeia da polimerase (PCR), utilizando os iniciadores 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') (FURUSHITA et al., 2003) e Amp2 (5'-AAG GAG GTG ATC CAR CCG CA-3') (WANG et al., 1996). A PCR continha 50 ng de DNA, 1X buffer, 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTPs, 1,0 U Taq DNA *polymerase* e de 0,2 pMol de cada primer em um volume final de reação

de 50 µL. Essas reações foram incubadas no termociclador ependorf e as etapas de resfriamento e aquecimento da reação foram: temperatura de desnaturação de 94°C por 3 minutos, seguida de 29 ciclos (94°C por 1 minuto, temperatura de anelamento de 65°C por 1 minuto e 72°C por 1,5 minutos) e temperatura de extensão final de 72°C por 5 minutos. O fragmento amplificado foi avaliado em gel de agarose com concentração de 0,7% e a amostra amplificada foi sequenciada no sequenciador automático 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystem®) do Laboratório de Genômica da Embrapa Agrobiologia. Após o alinhamento das sequências, estas foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados (Genbank database - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), utilizando o programa BLAST-N (ALTSHUL et al., 1997) e limitando a busca para sequências depositadas no banco de dados de 16S RNAr. Após a comparação das sequências com o banco de dados, as mesmas foram analisadas filogeneticamente, utilizando o programa MEGA para construção da árvore filogenética calculada utilizando o algoritmo *Neighbor-Joining* (NJ).

**c) Avaliação da capacidade antagonista das estirpes de *Bacillus* contra as raças de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici***

**c.1) Ação indireta: produção de compostos voláteis**

O controle de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* pelas bactérias isoladas de cana-de-açúcar e de plantas de tomate pela produção de voláteis foi avaliada seguindo metodologia descrita por Cordero et al. (2014). O meio de cultura utilizado foi o BDA (Batata-Dextrose-Agar) com pH ajustado para 6,0. Um volume de 20 mL de meio de cultura BDA foi vertido em placas de Petri descartáveis e, após a solidificação do meio, uma faixa de um centímetro (da parte de maior diâmetro da placa) de meio de cultura foi cortado e removido da placa com auxílio de um bisturi estéril. Um pedaço de micélio foi colocado sobre uma metade do meio de cultura e a estirpe bacteriana foi semeada na outra metade, sem que houvesse contato entre ambos. As placas de Petri foram imediatamente vedadas com Parafilme (Parafilm “M”®, Bemis® Flexible Packaging, WI 54956) e incubadas a uma temperatura de 30°C. Quatro dias após a inoculação foi realizada a medição do tamanho da colônia fúngica para verificar a inibição de crescimento micelial devido a possível produção de compostos voláteis pelas estirpes bacterianas. Como controle positivo foi usado uma placa de Petri contendo somente o fungo inoculado visando comparar o crescimento micelial na presença e ausência da bactéria.

**c.2) Ação direta: método de estrias paralelas**

A capacidade antagonista das estirpes bacterianas também foi avaliada em placas de Petri contendo o meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Agar) através do crescimento do fungo na presença das estirpes bacterianas. As estirpes bacterianas foram inicialmente cultivadas em placas de Petri contendo meio BDA a 30°C durante 24 horas. Após este período, as colônias foram homogeneizadas com solução salina para se obter a mesma concentração de inóculo para todas as estirpes utilizadas. As estirpes foram então semeadas sobre o meio BDA, fazendo-se duas estrias paralelas equidistantes do fungo, sendo cada uma delas 20 mm de distância do fitopatógeno e diâmetro total da placa de Petri de 90 mm. Os fungos foram inoculados no centro da placa, entre as duas estrias das bactérias. As placas foram incubadas a 30°C durante 6 dias. Após este período o tamanho da colônia fúngica foi medido com auxílio de um paquímetro digital e comparado com o tamanho da colônia fúngica quando crescida em placa na ausência da bactéria.

#### 4.1.2.2 Atividades funcionais das estirpes bacterianas – *in vitro*

##### a) Atividade celulolítica

A atividade celulolítica das estirpes foi avaliada utilizando-se o método de iodine conforme descrito por Kasana et al. (2008). Cerca de 5,0 µL de cultura crescida “overnight” foi plaqueado em meio CMC ágar (0,2% de NaNO<sub>3</sub>, 01% de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,05% de MgSO<sub>4</sub>, 0,5% de KCl, 0,2% de CMC forma sódica (carboximetilcelulose), 0,02% de peptone e 1,7% de ágar) em triplicata. As placas contendo as bactérias foram incubadas a 30°C durante o período de 48 horas. Após a incubação as placas foram inundadas com solução de iodine (2,0 g de KI, 1,0 g de iodine diluído em 300 mL de água destilada) durante 3-5 minutos. O excesso de solução foi drenado e a presença de halo ao redor das colônias bacterianas indica resultado positivo para a atividade celulolítica.

##### b) Produção de indol

As estirpes foram cultivadas em tubos de ensaio contendo 5 ml de meio NB (Nutrient Broth - (g/L) 1 g de extrato de carne, 2 g de extrato de levedura, 5 g de peptona, 1 g de NaCl, água destilada em quantidade suficiente para 1000 mL, pH 6,0) suplementado com triptofano na concentração de 500 µg/mL (RADDADI et al., 2008), durante 72 horas a 30°C e 200 rpm no escuro (tubos de ensaio envoltos com papel alumínio). A cultura crescida foi centrifugada a 10.000 rpm por 5 minutos e alíquotas de 150 µL do sobrenadante foram transferidas para microplacas de poliestireno de 96 poços com capacidade para 300 µL cada poço. Em cada poço, contendo o sobrenadante da cultura, foram adicionados 100 µL do reagente Salkowski (1 mL de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O 0,5 M + 50 mL de HClO<sub>4</sub> (35%)) (GORDON; WEBER, 1951). A reação foi mantida no escuro durante 30 minutos a temperatura ambiente e para cada amostra foram feitas três repetições. A produção de indols (AIA) foi considerada positiva para as reações que mostraram mudanças na coloração da reação, sendo positiva (rosa) e negativa (transparente). A leitura da absorbância foi realizada através de espectrofotômetro (λ) (540 nm) para quantificação da produção de indols. Foi feita uma curva de calibração de auxina empregando método descrito por Sarwar e Kremer (1995) para quantificação da produção de auxina pelas estirpes. Inicialmente foi preparado uma solução de auxina sintético da marca Sigma na concentração de 10 mM, em seguida foram feitas diluições crescentes de 0 a 1000 µM de auxina para construção da curva. Alíquotas de 150 µL de cada diluição foram colocadas em microplacas de poliestireno com capacidade de 300 µL cada poço. Cada diluição foi transferida para os poços em triplicatas. Foram adicionados as diluições 100 µL do reagente Salkowski. A reação ficou agindo no escuro durante 30 minutos em temperatura ambiente as amostras foram avaliadas utilizando espectrofotômetro em comprimento de onde de (λ) 540 nm.

##### c) Solubilização de fosfato e zinco *in vitro*

A capacidade das estirpes em solubilizar zinco e fosfato inorgânico *in vitro* foi realizada em placas contendo meio NBRIP sólido (10 g de glicose, 5 g de MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 0,25 g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,2 g de KCl, 0,1 g de (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub> e 15 g.L<sup>-1</sup> de ágar adicionados a 1000 mL de água destilada). O teste de solubilização de fosfato foi realizado na presença de 5 g.L<sup>-1</sup> de Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> e o de solubilização de zinco foi feito na presença de 1,2 g.L<sup>-1</sup> de ZnO) conforme descrito por NAUTIYAL (1999).

As bactérias foram crescidas em 5 mL de meio BHI - Brain Heart Infusion (Becton, Dickinson and Company<sup>®</sup>, USA, cat. # 237500) pH 7,0 a 30°C por 16 horas a 200 rpm. Cerca de 10 µl das culturas bacterianas foram inoculados em placas de Petri contendo 20 mL de meio

NBRIP com ZnO (pH 7,0) e em placas contendo 20 mL de meio NBRIP com  $(Ca_3(PO_4)_2)$  (pH 7,0) e incubadas a 30°C durante 15 dias. O teste foi realizado em triplicata e a solubilização de zinco e de fosfato foi considerada positiva para as estirpes que formaram halo ao redor da colônia. O diâmetro do halo formado e da colônia foi medido no 15º dia de crescimento da cultura (NAUTIYAL, 1999), utilizando paquímetro digital. A fórmula desenvolvida por Kumar e Narula (1999) foi utilizada para calcular o índice de solubilização (I.S.), onde I.S. é igual ao diâmetro do halo (mm) dividido pelo diâmetro da colônia (mm). A bactéria diazotrófica *Gluconacetobacter diazotrophicus* estirpe PAL 5 (BR 11281), isolada de tecidos da planta de cana-de-açúcar e já conhecida quanto a capacidade em solubilizar fosfato inorgânico (MAHESHKUMAR et al., 1999) e zinco *in vitro* (SARANAVAN et al., 2006) foi utilizada como controle positivo nos testes de solubilização de fosfato e de zinco. A bactéria *G. diazotrophicus* estirpe PAL 5 foi crescida em meio líquido DYGS (2 g de glicose, 2 g de ácido málico, 2 g de peptona bacteriológica, 2 g de extrato de levedura, 0,5 g de  $K_2HPO_4$ , 0,5 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1,5 g de ácido glutâmico, adicionados a 1000 mL de água destilada, pH 6,0) (RODRIGUES NETO et al., 1986) a temperatura de 30°C por 24 horas a 200 rpm. Após o crescimento a estirpe PAL 5 foi transferida para 20 mL de meio NBRIP contendo  $(Ca_3(PO_4)_2)$  ou ZnO assim como as outras estirpes usadas nos testes.

#### **d) Atividade proteolítica**

A atividade proteolítica das estirpes bacterianas foi avaliada seguindo protocolo descrito por Saran et al. (2007). As estirpes bacterianas foram crescidas durante a noite e 5 µL de suspensão bacteriana foram plaqueados em triplicata em 20 mL de meio de cultura. O meio de cultura foi preparado pela mistura dos seguintes componentes: 20 g de ágar dissolvidos em 200 mL de água destilada; 20 g de leite desnatado dissolvidos em 200 mL de água destilada e 600 mL de solução de  $K_2HPO_4$  0,2 M, pH 7,0 (ajustado com KOH). Todos os componentes do meio foram autoclavados separadamente antes do uso para evitar a coagulação e carbonização do leite devido a presença de sais (SARAN et al., 2007). As placas inoculadas foram incubadas durante dois dias a 30°C. A presença de zona clara ao redor da colônia, formando um halo, indica a atividade proteolítica.

#### **4.1.3 *F. oxysporum* f. sp. lycopersici**

##### **a) Crescimento dos fungos**

As raças 1, 2 e 3 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* utilizadas neste trabalho foram adquiridas através de compra da coleção de fungos do Instituto Biológico de São Paulo (Micoteca Mário Barreto Figueiredo). O meio de cultivo utilizado para crescimento das três raças foi o meio BDA (Batata-Dextrose-Agar - 200 g de batata descascada, 20 g de ágar e 20 g de dextrose avolumados para 1000 mL de água destilada) e as condições de cultivo foram de crescimento a 25°C por um período de 15 dias para produção de esporos.

##### **b) Seleção de genótipos de tomateiro suscetíveis a *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici***

Foram usados quatro genótipos de tomateiro (híbrido Débora Plus, híbrido Santa Clara Miss Brasil, variedade Perinha e variedade Carolina) para avaliar a patogenicidade das raças 1, 2 e 3 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. As características das sementes estão descritas na tabela 3.

Tabela 3. Características das sementes usadas no ensaio de seleção de genótipos de tomateiro suscetíveis as raças de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

<b>Genótipos de tomateiro</b>	<b>Origem das Sementes</b>	<b>Resistência as raças do fungo (de acordo com a empresa - embalagem)</b>
Débora Plus (Híbrido)	Comercial - Marca Sakata	Raças 1 e 2
Santa Clara Miss Brasil (Híbrido)	Comercial - Marca Topseed	Raça 1
Perinha (Variedade)	Banco de sementes do laboratório de Epidemiologia e Patologia de Sementes (UFRRJ)	Não determinada
Carolina (Variedade)	Comercial - Marca Feltrin	Raças 1 e 2

As cultivares foram germinadas em sementeiras e 15 dias após a semeadura as raízes das plantas foram lavadas e colocadas sobre papel toalha em uma superfície limpa por aproximadamente 10 minutos para favorecer a murcha natural da planta. Cerca de dois centímetros das raízes foram cortados para facilitar a entrada do fungo na planta através dos ferimentos. Em seguida, foram embebidas na suspensão de conídios com concentração de  $10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup> de substrato e transferidas para copos de isopor contendo substrato (substrato comercial Carolina + esterco bovino). As plantas foram mantidas em casa de vegetação por aproximadamente 15 dias e imediatamente após o aparecimento dos sintomas de murcha-defusário as mesmas foram levadas ao laboratório para reisolamento do fungo e medição da área interna da haste da planta colonizada pelo fungo. Foram avaliadas 5 plantas de cada genótipo por tratamento.

#### **4.2 Inoculação de Substrato com as Raças de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici***

As raças de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* foram inoculadas individualmente no substrato (solo : areia : substrato comercial Carolina, na proporção 1:1:1) em uma concentração de  $10^4$  conídios.mL<sup>-1</sup> de substrato dois dias antes do transplantio das mudas de tomateiro visando favorecer o desenvolvimento do fungo e permitir avaliar o efeito patogênico do fungo e a atividade de biocontrole promovido pela bactéria. O fungo foi inicialmente crescido em placas de Petri contendo meio BDA a uma temperatura de 25°C durante 20 dias para obtenção de esporos. Após o crescimento a placa foi imersa com água destilada estéril e com auxílio de um pincel os esporos foram homogeneizadas na água para realizar a contagem do número de esporos utilizando a câmara de Neubauer com auxílio de microscópico. Após a contagem foi feito o cálculo da concentração de conídios.mL<sup>-1</sup> de substrato para a inoculação do fungo no substrato.

#### **4.3 Seleção das Estirpes com Atividade Antagônica as Raças de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici***

As plantas de tomateiro da variedade Perinha, com 20 dias de idade foram retiradas das sementeiras (caixas de polipropileno com capacidade de 200 células) com substrato comercial (Carolina) e lavadas para retirada de todos os resíduos de substrato. As plantas ficaram sobre papel toalha em uma superfície limpa por aproximadamente 10 minutos, a fim de favorecer a murcha natural da planta. Após esse período, cerca de dois centímetros das raízes foram cortados e embebidas na suspensão bacteriana com concentração de  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> e transferidas para

bandejas de plástico contendo 15 Kg de substrato (solo : areia : substrato comercial na proporção 1:1:1) contaminado com o fungo *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* e para bandejas não contaminadas com o fungo. Os estudos de seleção foram iniciados com a raça 1 do fungo confrontado com 50 isolados de bactérias originárias tanto de tomateiro como do fluido de cana-de-açúcar (Tabela 3). As bactérias isoladas do apoplasto de cana-de-açúcar foram selecionadas com base nas características de produção de AIA e solubilização de fosfato inorgânico e zinco, além de outras características obtidas com o teste com tomateiro (Tabela 2). Já as bactérias isoladas de tomateiro foram selecionadas aleatoriamente, pois neste momento ainda não se conhecia as características funcionais dos isolados. No entanto, foram selecionados mais isolados oriundos de plantas saudáveis de tomate presente em área com incidência do fungo (Localidade 2 - Serra Velha), descritos na tabela 4. Como controles foram usadas plantas inoculadas somente com bactérias em substrato não contaminado com fungo e plantas não inoculadas com bactérias em substrato contaminado com fungo. O delineamento experimental utilizado foi blocos ao acaso com 12 plantas por tratamento.

A coleta das plantas de tomateiro do experimento com a raça 1 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* foi realizada 15 dias após o transplante das plantas inoculadas com bactérias. Foram coletadas 10 plantas centrais (as plantas das bordas foram descartadas) para avaliação. As plantas foram removidas do substrato e lavadas em água corrente para análise de massa fresca e medições de comprimento total (do ápice ao hipocótilo), comprimento da parte aérea, comprimento do sistema radicular e comprimento da infecção causada pelo fungo. Para verificar se houve colonização do fungo nas plantas estas foram seccionadas verticalmente na região do colo de modo a quantificar a porcentagem de infecção causada pelo fungo e analisar quais estirpes bacterianas apresentaram potencial antagonístico contra a raça 1 do fungo.

O experimento com a raça 2 e com a raça 3 do fungo foi realizado utilizando as estirpes bacterianas que apresentaram melhores resultados no experimento com a raça 1. Os experimentos foram realizados seguindo a mesma metodologia utilizada no experimento com a raça 1 do fungo. No entanto, as bandejas de plástico utilizadas no primeiro experimento foram substituídas por tubetes já que no experimento com a raça 1 não foi possível avaliar o crescimento radicular, pois o sistema radicular das plantas de diferentes tratamentos se misturaram.

Tabela 4. Origem das bactérias endofíticas do gênero *Bacillus* utilizadas no experimento em casa de vegetação para avaliação do potencial de controle da raça 1 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* quando inoculadas em tomateiro cultivados em substrato na presença do fungo.

Isolados	Tecido da planta usada para o isolamento	Localidade do isolamento da bactéria
S76	-	-
PAL 5	-	-
2	Parte aérea sadia (Tomateiro)	2 - Serra Velha (Nova Friburgo - RJ)
8		
10		
11		
12		
15		
16		
17		
18		

20		
21	Raiz sadia (Tomateiro)	
22		
24		
25		
26		
27		
28		
29		
32		
33		
40	Parte aérea sem sintoma de doença (Tomateiro)	3 - Serra Velha (Nova Friburgo - RJ)
48	Raiz sem sintoma de doença (Tomateiro)	
51	Parte aérea sem sintoma de doença (Tomateiro)	4 - Rio Grande (Nova Friburgo - RJ)
73	Raiz sem sintoma de doença (Tomateiro)	
87	Parte aérea sem sintoma de doença (Tomateiro)	7 - Rio Grande (Nova Friburgo - RJ)
102	Raiz sem sintoma de doença (Tomateiro)	
113.1	Raiz sem sintoma de doença (Tomateiro)	
119	Parte aérea sem sintoma de doença (Tomateiro)	F (Nova Friburgo - RJ)
137	Raiz sem sintoma de doença (Tomateiro)	
146	Raiz sem sintoma de doença (Tomateiro)	
154	Parte aérea necrosada (Tomateiro)	1 (Nova Friburgo - RJ)
178	Raiz necrosada (Tomateiro)	
3 C	Líquido do apoplasto de cana-de-açúcar	Londrina - PR
8 C		Coruripe - AL
12 C		Campina - SP
20 C		
21 C		
22 C		
23 C		
27 C		Piracicaba - SP
28 C		
32 C		
33 C		Seropédica - RJ
36 C		

38 C		
42 C		
48 C		

#### 4.4 Análise Estatística

As variáveis avaliadas nos experimentos em casa de vegetação foram analisadas utilizando o software SISVAR através da análise de variância e as médias comparadas entre si pelo teste Scott-Knott (1974) com nível de significância a 5%.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Isolamento de Bactérias de Tomateiro Cultivados em Áreas Produtoras de Nova Friburgo - RJ com Incidência de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Foram obtidos 193 isolados de bactérias com características morfológicas semelhantes as de bactérias do gênero *Bacillus* tais como: colônias brancas, grandes, com bordas irregulares, opaco e aveludado conforme indicado por LOGAN e De VOS (2009). Um total de 120 bactérias foram isoladas da parte aérea (haste) de tomateiro conforme representantes mostrados na figura 2 e 73 bactérias foram isoladas das raízes de tomateiro conforme representantes mostrados na figura 3, sendo 33 isolados obtidos de planta sadia da Propriedade 2 - Serra Velha, 17 isolados de planta sem sintoma de doença da Propriedade 3 - Serra Velha, 27 isolados de planta sem sintoma de doença da Propriedade 4 - Rio Grande, 37 isolados de planta sem sintoma de doença da Propriedade 7 - Rio Grande, 36 isolados de planta sem sintoma de doença da Propriedade F e 43 isolados de planta necrosada da Propriedade 1.

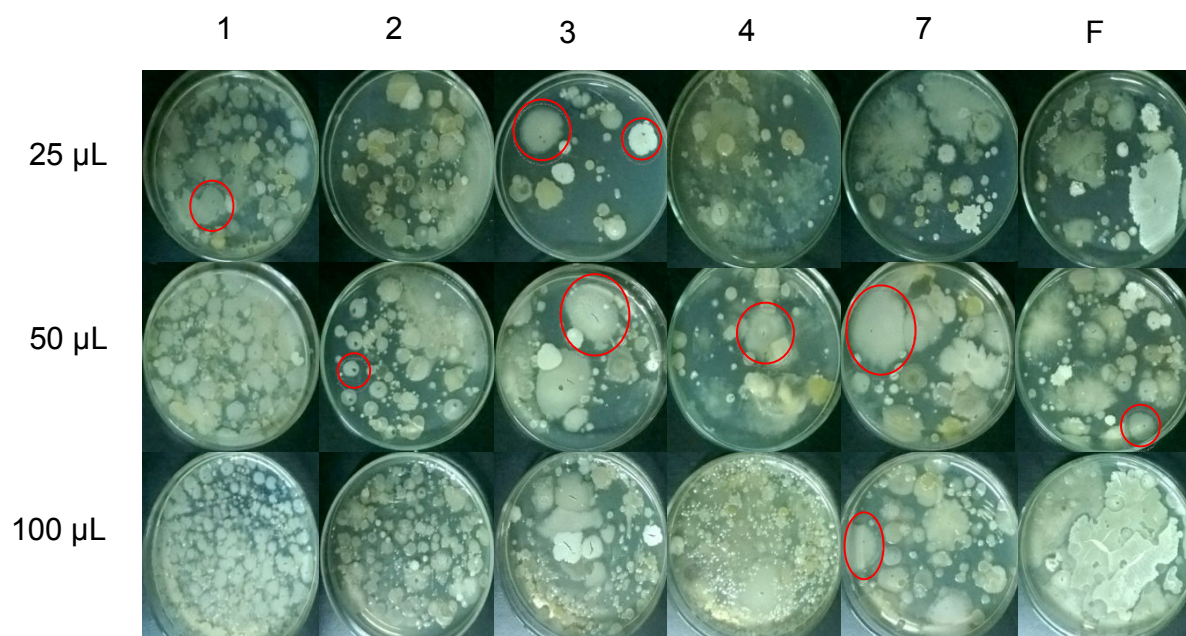


Figura 2. Exemplos de crescimento em meio de cultivo LB de bactérias isoladas da parte aérea de tomateiro originários das regiões produtoras 1, 2, 3, 4, 7 e F com diferentes quantidades de suspensão pasteurizada (25 µL, 50 µL e 100 µL). Em destaque pode-se observar colônias com morfotipo de *Bacillus*.



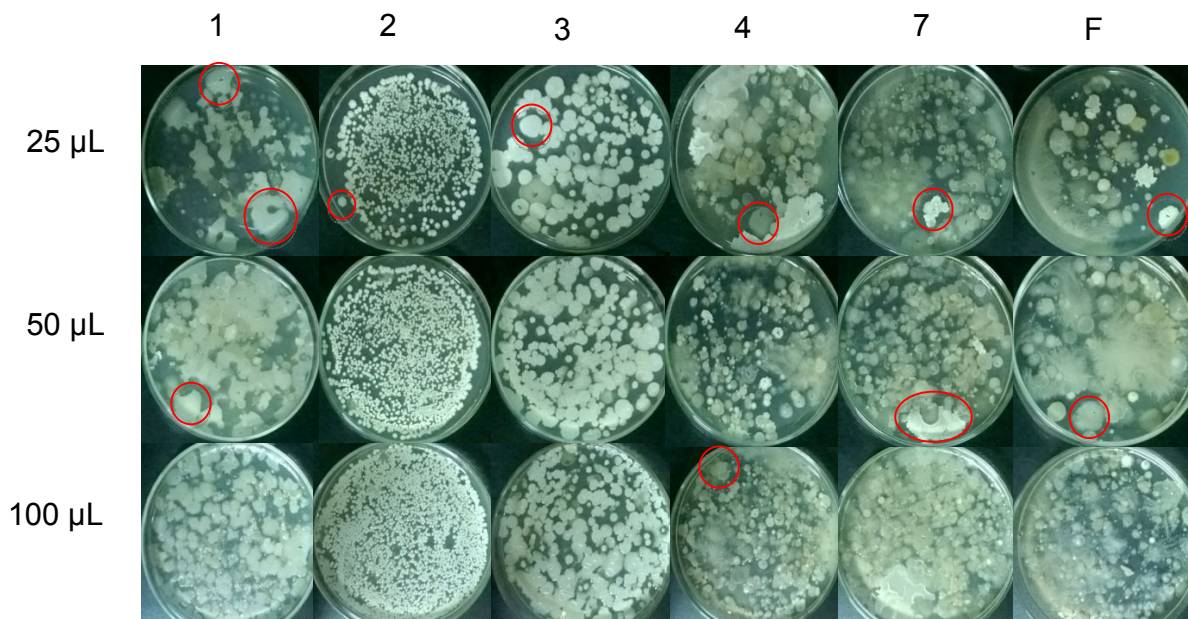


Figura 3. Exemplos de crescimento em meio de cultivo LB de bactérias isoladas do sistema radicular de tomateiro originários das regiões produtoras 1, 2, 3, 4, 7 e F com diferentes quantidades de suspensão pasteurizada (25  $\mu$ L, 50  $\mu$ L e 100  $\mu$ L). Em destaque pode-se observar colônias com morfotipo de *Bacillus*.

Ao analisar as placas após o crescimento das bactérias com diferentes quantidades de inóculo pode-se concluir que mesmo aplicando somente 25  $\mu$ L da suspensão pasteurizada sobre o meio de cultura uma grande quantidade de bactérias pode ser observada, indicando uma alta população de bactérias colonizando tomateiros endofiticamente. Muitas bactérias apresentavam características morfológicas a bactérias do gênero *Bacillus* apesar de alguns autores relatarem que o solo (VARY et al., 2007; ASSAEEDI et al., 2011) e o filoplano de plantas (SMITH & COUCHE, 1991; ARIAS et al., 1999) são os nichos principais dessas bactérias e não o interior de plantas. No entanto, outros autores também isolaram bactérias endofíticas do gênero *Bacillus* colonizando diferentes tecidos de tomateiro, como as folhas (BARRETI et al., 2009; KEFI et al., 2015), hastes (FENG et al., 2013; LIN et al., 2015; KEFI et al., 2015), raízes (FENG et al., 2013; KEFI et al., 2015) e frutos (KEFI et al., 2015).

## 5.2 Identificação de Bactérias - Coloração de Gram e Preservação

O teste de coloração de Gram mostrou que algumas bactérias selecionadas apresentaram semelhança com bactérias do gênero *Bacillus* conforme a coloração azulada das células que é característica de bactérias Gram positivas. No entanto, algumas bactérias com características morfológicas de *Bacillus*, apresentaram coloração avermelhada sugerindo serem Gram negativas. Resultado semelhante foi encontrado por Rocha (2013) que observou que algumas bactérias apresentavam coloração avermelhada (característica de Gram negativa), as quais foram confirmadas como pertencentes ao gênero *Bacillus* através de sequenciamento da subunidade 16S RNAr. Isso pode ser explicado devido a algumas bactérias deste gênero apresentarem características de Gram positivas ou Gram variáveis (a coloração de Gram não é positiva em cultivos jovens). O teste de Gram foi realizado 16 horas após o crescimento o que pode ter

contribuído para o resultado variável conforme demonstrado na Figura 4. Todos os isolados apresentam morfologia de baciliformes. As bactérias foram preservadas sob óleo mineral estéril em frascos de penicilina após a inoculação e o crescimento das bactérias por 16 horas no meio de cultivo LB (Luria Bertani, pH 7,0) (Figura 5). Para preservação em glicerol, as bactérias foram crescidas em placas de Petri contendo meio de cultivo LB sólido (Luria Bertani, pH 7,0) por 16 horas seguido da realização de uma suspensão das colônias crescidas com glicerol 10% estéril e posterior armazenamento em tubos de criogenia a -20°C (Figura 5).

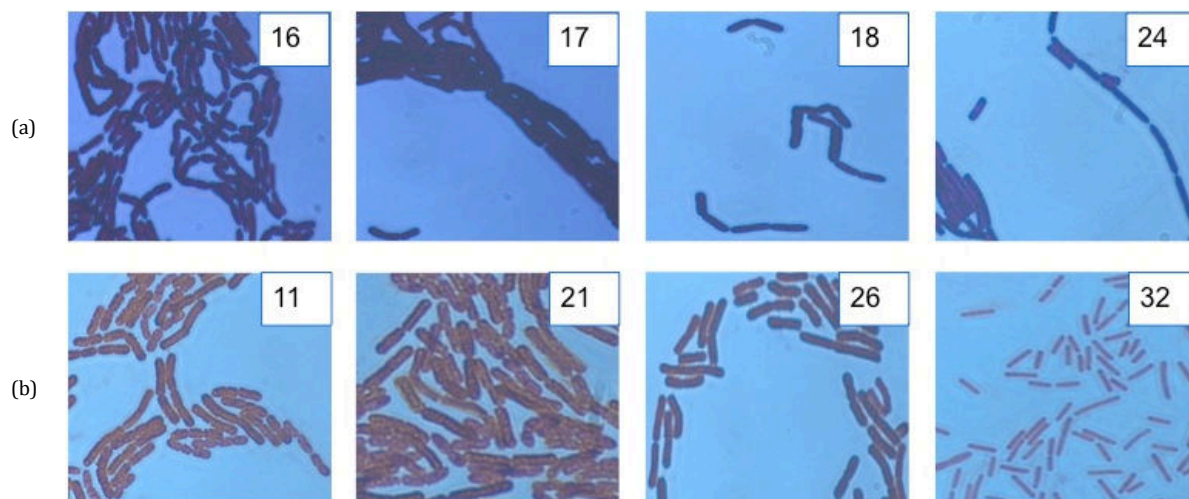


Figura 4. Exemplos de bactérias Gram positivas e Gram variáveis analisadas através de metodologia de Coloração de Gram em microscópico óptico com objetiva de imersão, aumento de 100 X. (a) Bactérias Gram positivas (isolados - 16, 17, 18 e 24) e (b) Bactérias Gram variáveis (isolados 11, 21, 26 e 32).

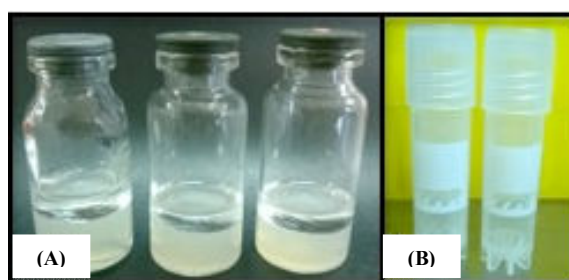


Figura 5. Métodos de preservação das bactérias endofíticas isoladas de raízes e hastes de tomateiro: (A) óleo mineral e (B) glicerol 10%.

### 5.3 Sequenciamento da Subunidade 16S RNAr dos Isolados Bacterianos Originários de Tomateiro

O resultado do sequenciamento da região 16S RNAr de 32 estirpes bacterianas obtidas de tomateiro após o processo de pasteurização, utilizando os iniciadores 27F e Amp2, confirmou que essas bactérias pertencem ao gênero *Bacillus*, sendo observado uma alta similaridade das bactérias com as espécies *B. thuringiensis* (25%), *B. megaterium* (34,4%), *B. cereus* (25%), *B. toyonensis* (3,1), *B. stratosphericus* (9,4%). No entanto, um dos isolados pertence a espécie *Paenibacillus barcinonensis* (3,1%) (Tabela 5). Diversos estudos relataram a presença de

bactérias do gênero *Bacillus* colonizando endofiticamente diferentes tecidos de plantas, como por exemplo Feng et al. (2013) que isolaram bactérias do gênero *Bacillus* de raízes e hastes de tomateiro resistente e suscetível a *Ralstonia solanacearum* em diferentes estágios de crescimento (germinação, plântula, floração e frutificação). Esses autores constataram que durante o período de floração a população endofítica de bactérias é maior que nas outras fases de crescimento. Bactérias pertencentes aos gênero *Bacillus* também foram isoladas de diversos tecidos de plantas como de nódulos de raízes de *Sophora alopecuroides* (ZHAO et al., 2011), de folhas e caules de eucalipto (PAZ et al., 2012), de raízes de bananeira (SOUZA et al., 2013), do líquido do apoplasto de plantas de cana-de-açúcar (VELÁZQUEZ et al., 2008; MELO et al., submetido) e de folhas de cana-de-açúcar (MAGNANI et al., 2010), indicando que essas bactérias além de apresentarem como nicho ecológico o solo (VARY et al., 2007; ASSAEEDI et al., 2011) e o filoplano (SMITH & COUCHE, 1991; ARIAS et al., 1999) também podem estar associadas aos tecidos de plantas.

Tabela 5. Similaridade filogenética das estirpes bacterianas isoladas de tomateiros cultivados na região de Nova Friburgo, RJ.

Número de identificação do isolado	Similaridade filogenética baseada na sequência da subunidade 16S RNAr			
	Similaridade	Valor E	Identidade (%)	Nº Acesso
2	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain IAM 12077 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	99	<a href="#">NR_043403.1</a>
8	<i>Bacillus thuringiensis</i> Bt407 16S ribosomal RNA, complete sequence	0.0	99	<a href="#">NR_102506.1</a>
10	<i>Bacillus megaterium</i> strain ATCC 14581 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	99	<a href="#">NR_117473.1</a>
11	<i>Bacillus megaterium</i> strain ATCC 14581 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	99	<a href="#">NR_117473.1</a>
12	<i>Bacillus megaterium</i> strain ATCC 14581 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	99	<a href="#">NR_117473.1</a>
15	<i>Bacillus megaterium</i> strain ATCC 14581 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	99	<a href="#">NR_117473.1</a>
16	<i>Bacillus megaterium</i> strain ATCC 14581 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	99	<a href="#">NR_117473.1</a>
17	<i>Bacillus megaterium</i> strain ATCC 14581 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	99	<a href="#">NR_117473.1</a>
18	<i>Bacillus megaterium</i> strain ATCC 14581 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	99	<a href="#">NR_117473.1</a>
20	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain IAM 12077	0.0	99	<a href="#">NR_043403.1</a>

	16S ribosomal RNA gene, partial sequence			
	<i>Bacillus megaterium</i> strain ATCC 14581			
21	16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	99	<a href="#">NR_117473.1</a>
	<i>Bacillus thuringiensis</i> Bt407			
22	16S ribosomal RNA, complete sequence	0.0	99	<a href="#">NR_102506.1</a>
	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain IAM 12077			
24	16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	99	<a href="#">NR_043403.1</a>
	<i>Bacillus megaterium</i> strain ATCC 14581			
25	16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	99	<a href="#">NR_117473.1</a>
	<i>Bacillus megaterium</i> strain ATCC 14581			
26	16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	99	<a href="#">NR_117473.1</a>
	<i>Bacillus stratosphericus</i> strain 41KF2a			
27	16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	99	<a href="#">NR_042336.1</a>
	<i>Bacillus thuringiensis</i> Bt407			
28	16S ribosomal RNA, complete sequence	0.0	99	<a href="#">NR_102506.1</a>
	<i>Bacillus stratosphericus</i> strain 41KF2a			
29	16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	99	<a href="#">NR_042336.1</a>
	<i>Paenibacillus barcinonensis</i> strain BP-23			
32	16S ribosomal RNA gene, complete sequence	0.0	98	<a href="#">NR_042272.1</a>
	<i>Bacillus stratosphericus</i> strain 41KF2a			
33	16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	99	<a href="#">NR_118439.1</a>
	<i>Bacillus thuringiensis</i> Bt407			
40	16S ribosomal RNA, complete sequence	0.0	99	<a href="#">NR_102506.1</a>
	<i>Bacillus cereus</i> strain CCM 2010			
48	16S ribosomal RNA gene, complete sequence	0.0	99	<a href="#">NR_115714.1</a>
	<i>Bacillus megaterium</i> strain ATCC 14581			
51	16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	99	<a href="#">NR_117473.1</a>
	<i>Bacillus cereus</i> strain CCM 2010			
73	16S ribosomal RNA gene, complete sequence	0.0	99	<a href="#">NR_115714.1</a>
	<i>Bacillus cereus</i> strain CCM 2010			
87	16S ribosomal RNA gene, complete sequence	0.0	99	<a href="#">NR_115714.1</a>
	<i>Bacillus thuringiensis</i> Bt407			
102	16S ribosomal RNA, complete sequence	0.0	99	<a href="#">NR_102506.1</a>
	<i>Bacillus cereus</i> strain CCM 2010			
113.1	16S ribosomal RNA gene, complete sequence	0.0	99	<a href="#">NR_115714.1</a>
	<i>Bacillus toyonensis</i> strain BCT-7112			
119	16S ribosomal RNA gene, complete sequence	0.0	99	<a href="#">NR_121761.1</a>



137	<i>Bacillus cereus</i> strain CCM 2010 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	0.0	99	<a href="#">NR_115714.1</a>
146	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 16S ribosomal RNA (rrnA) gene, complete sequence	0.0	99	<a href="#">NR_074540.1</a>
154	<i>Bacillus cereus</i> strain CCM 2010 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	0.0	99	<a href="#">NR_115714.1</a>
178	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 16S ribosomal RNA (rrnA) gene, complete sequence	0.0	99	<a href="#">NR_074540.1</a>

A análise filogenética dos 32 isolados de tomateiro com base no sequenciamento da região 16S RNAr realizada no programa MEGA V6.0 aplicando o algoritmo *Neighbor-Joining* (NJ), possibilitou a identificação de 4 grupos (Figura 6). O maior grupo (I) foi composto por 17 isolados (2, 8, 20, 22, 24, 28, 40, 48, 73, 87, 102, 113.1, 119, 137, 146, 154 e 178) filiados as espécies *B. thuringiensis*, *B. cereus* e *B. toyonensis*, mostrando que estas espécies apresentam alta similaridade de sequências entre si. Todos os isolados apresentaram identidade de 99% com as sequências depositadas no banco de dados do geneBank. No entanto, o isolado 146 apresentou sequência similar a *B. cereus*, porém está mais distante filogeneticamente das outras bactérias que também foram identificadas como *B. cereus* (isolados 48, 73, 87, 113.1, 137, 146, 154 e 178). O grupo II foi composto por 11 isolados (10, 11, 12, 15, 16, 17, 18, 21, 25, 26 e 51) filiados a espécie *B. megaterium*. O grupo III é composto por três isolados (27, 29 e 33) que apresentaram identidade de 99% com a espécie *B. stratosphericus* (Tabela 5) e o isolado 32 formou o grupo IV, apresentando 98% de similaridade com o banco de dados de *P. barcinonensis*. No entanto, não se pode afirmar que as bactérias são pertencentes a essas espécies somente por análise de sequências do fragmento 16S RNAr, embora estudos recentes indicam que bactérias com valores de identidade entre sequências acima de 97% pertencem a mesma espécie (TINDALL et al., 2010). A hibridização DNA/DNA (VAN PHAM & KIM, 2014) tem sido a metodologia usada para diferenciar espécies do mesmo gênero. Van Pham e Kim (2014) através dos resultados de hibridização de DNA/DNA verificaram que uma estirpe era diferente das demais espécies do gênero *Bacillus*, sugerindo assim uma nova espécie denominada *Bacillus thaonhiensis*. Os autores não conseguiram identificar essa nova espécie somente através da análise de 16S RNAr, já que a mesma apresentou similaridade de 98,86% com *B. abyssalis*, 95,97% com *B. methanolicus*, 95,8% com *B. vietnamensis*, 95,5% com *B. seohaeanensis*, 95,33% com *B. timonensis* e 94,87% com *B. subtilis* subsp. *subtilis*.

A análise dos grupos e regiões mostrou que existe uma alta diversidade de bactérias do gênero *Bacillus* nas regiões produtoras de tomate, visto que foram isolados bactérias das espécies *B. thuringiensis* (grupo I), *B. cereus* (grupo I), *B. stratosphericus* (grupo III), *B. megaterium* (grupo II) e um isolado da espécie *P. barcinonensis* (grupo IV) em uma mesma região de Nova Friburgo - RJ (Serra Velha) (Figura 6 e Tabela 3). Em Rio Grande (Nova Friburgo - RJ) foram isoladas espécies de *B. megaterium* (grupo II), *B. cereus* (grupo I) e *B. thuringiensis* (grupo I). A bactéria *B. toyonensis* (grupo I) foi isolada da região F, juntamente com mais dois isolados de *B. cereus* (grupo I). Na região 1 foram isolados duas bactérias da espécie *B. cereus* (grupo I). Bactérias das espécies *B. megaterium*, *B. pumilus* e *B. cereus* foram isoladas de raízes e folhas de tomateiro por FENG et al.,(2013). Kefi et al. (2015) também relataram a ocorrência de *B. mojavensis*, *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* em órgãos de tomateiro. Bactérias das espécies *B.*

*polymixia* e *B. cereus* foram isoladas de raízes de tomateiro de vários municípios de Minas Gerais (BARRETI et al., 2008). Portanto, os estudos confirmam a ocorrência de bactérias do gênero *Bacillus* colonizando endofiticamente plantas de tomate e desta forma a exploração do potencial biotecnológico torna-se interessante visando atuar no controle principalmente de fungos do tipo fusário.

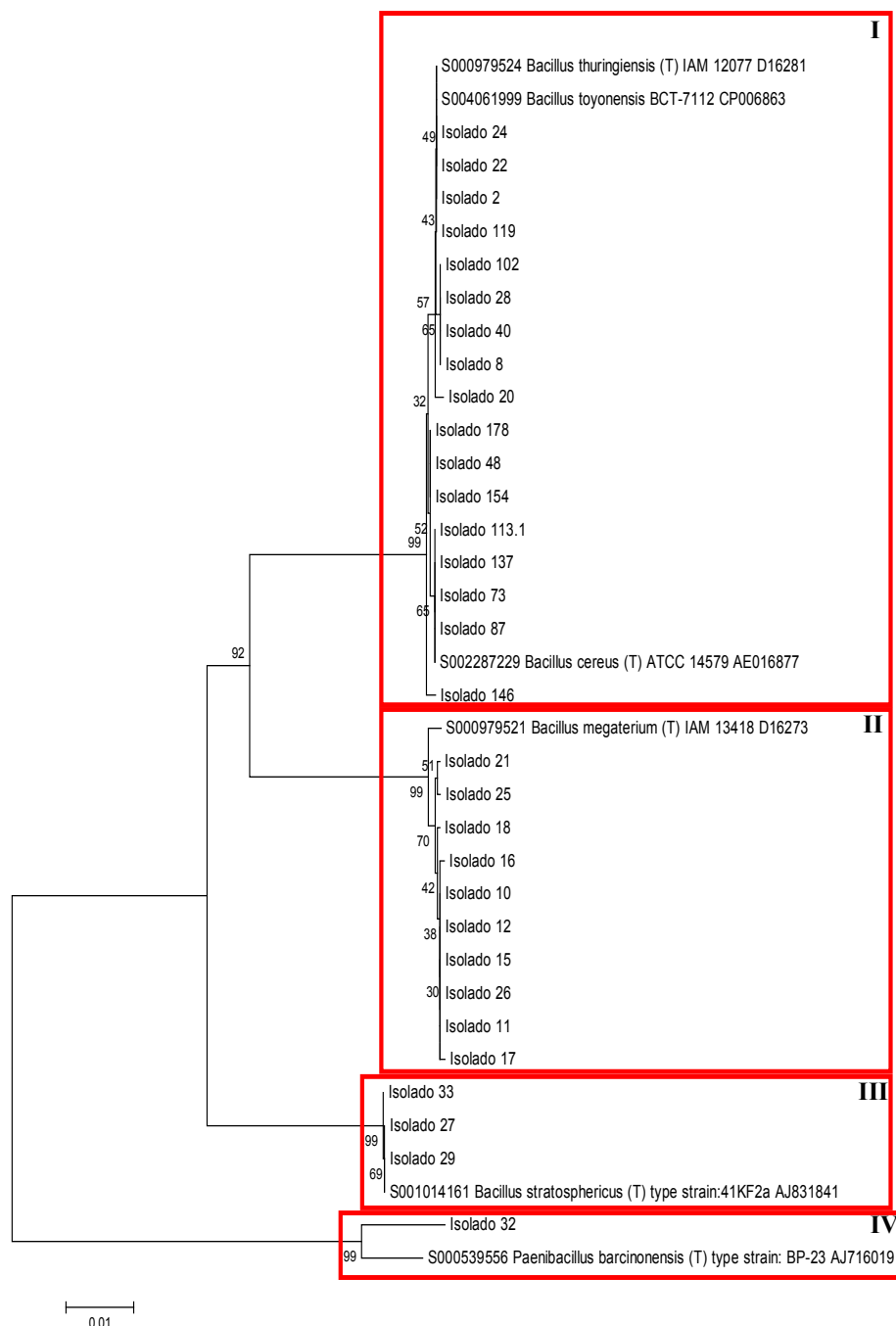


Figura 6. Árvore filogenética baseada nas seqüências 16S RNAr das estirpes bacterianas isoladas de tomateiro, calculada pelo algoritmo *Neighbor-Joining (NJ)*, fornecido pelo programa MEGA V6.0.

## 5.4 Resposta Antagônica das Estirpes Bacterianas as Raças 1, 2 e 3 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* em Testes *in vitro*

### 5.4.1 Ação indireta: produção de compostos voláteis

O teste de antagonismo associado a produção de voláteis pelas bactérias estudadas, mostrou que 27 estirpes bacterianas, de um total de 49, promoveram uma leve redução no crescimento micelial da raça 1 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* quando comparados com o controle (ausência das estirpes bacterianas) (tabela 6 - valores destacados em negrito). Em relação a raça 2 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, 43 estirpes bacterianas promoveram uma pequena redução no crescimento micelial em relação ao controle enquanto que essa redução ocorreu para 24 estirpes bacterianas frente a raça 3 do fungo. Essa pequena redução no crescimento micelial pode ser observada na figura 7. Estudo realizado por Leelasuphakul et al. (2008) mostrou que bactérias do gênero *Bacillus* produziram compostos voláteis que inibiram de 30 a 70% o crescimento micelial de *Penicillium digitatum* Sacc. Segundo Marroni e Germani (2011), um isolado de *Bacillus* foi eficaz no controle do agente etiológico da podridão de tronco da mamona (*Macrophomina phaseolina*) em teste de metabólitos voláteis produzido pelo isolado. Os resultados da literatura sugerem que bactérias do gênero *Bacillus* são eficazes no controle biológico de algumas doenças através da produção de compostos voláteis. Não sabemos, entretanto, as razões pelas quais não observamos nenhum efeito mais drástico das estirpes estudadas sobre o crescimento dos fungos. É possível que a vedação das placas não tenha sido eficiente para evitar a perda dos voláteis ou mesmo que a produção tenha sido muito pequena durante o período de avaliação. Outros estudos devem ser realizados para confirmar se a pequena redução do crescimento se deve ou não a produção de compostos voláteis. Uma metodologia que pode ser aplicada para investigar a produção de voláteis é a desenvolvida por Cordero et al. (2014) que mostraram a inibição do crescimento micelial de uma linhagem do fungo *F. proliferatum* pela produção de compostos voláteis pela bactéria *Pseudomonas fluorescens* em meio líquido com a bactéria e o fungo crescidos em frascos tipo kitasato conectados por tubos que permitem avaliar o tipo de volátil que é produzido. Os autores conseguiram identificar através de espectrometria de massa alguns compostos antifúngicos produzidos pela estirpe MGR12 (*P. fluorescens*) como por exemplo os compostos 1,3,5-heptatrieno, ciclo-tetradecano e um composto não identificado com tempo de retenção de 35,03. Os autores acreditam que o último composto esteja relacionado com o controle biológico de *F. proliferatum*, já que os outros dois compostos estavam presentes em meio de cultura puro.

Desta forma, um estudo mais detalhado deve ser realizado para saber se realmente são produzidos compostos voláteis pelas bactérias e caso esta produção seja positiva, deve-se realizar um estudo para conhecer esses voláteis, seus efeitos e suas características.

Tabela 6. Atividade antagônica das estirpes bacterianas as três raças de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* avaliada quatro dias após a inoculação (método de ação indireta).

Isolados	Isolado de plantas de:	Tamanho da colônia fúngica (mm)		
		Raça 1	Raça 2	Raça 3
Controle (Sem bactéria)		20,13	25,32	19,77
S76		21,51	25,65	21,14
PAL 5		<b>18,85 (6,4)</b>	<b>22,5 (11,1)</b>	21,38
2	TOMATEIRO	<b>19,8 (1,6)</b>	<b>23,43 (7,5)</b>	21,19

8		<b>18,64 (7,4)</b>	<b>22,86 (9,7)</b>	23,1
10		<b>18,31 (9,0)</b>	<b>23,5 (7,2)</b>	<b>19,7 (0,4)</b>
11		21,16	<b>21,8 (13,9)</b>	<b>19,28 (2,5)</b>
12		20,91	<b>23,65 (6,6)</b>	<b>18,68 (5,5)</b>
15		20,24	<b>23,63 (6,7)</b>	21,41
16		<b>19,64 (2,4)</b>	<b>22,46 (11,3)</b>	<b>18,82 (4,8)</b>
17		21,13	27,77	20,3
18		<b>19,16 (4,8)</b>	<b>24,25 (4,2)</b>	20,44
20		<b>18,27 (9,2)</b>	<b>22,4 (11,5)</b>	19,78
21		<b>20,09 (0,2)</b>	26,96	20,35
22		<b>19,95 (0,9)</b>	<b>22,32 (11,8)</b>	20,11
24		<b>18,94 (5,9)</b>	<b>22,02 (13,0)</b>	<b>19,54 (1,2)</b>
25		20,17	<b>22,92 (9,5)</b>	<b>18,33 (7,3)</b>
26		<b>19,01 (5,6)</b>	<b>24,88 (1,7)</b>	<b>19,56 (1,1)</b>
27		<b>19,16 (4,8)</b>	<b>22,12 (12,6)</b>	<b>19,25 (2,6)</b>
28		21,04	<b>22,51 (11,1)</b>	<b>18,89 (4,5)</b>
29		<b>18,93 (6,0)</b>	<b>24,75 (2,3)</b>	<b>19,12 (3,3)</b>
32		21,22	<b>24,75 (2,3)</b>	<b>18,3 (7,4)</b>
33		<b>20,03 (0,5)</b>	<b>23,29 (8,0)</b>	<b>18,88 (4,5)</b>
40		23,3	<b>22,85 (9,8)</b>	20,39
48		23,3	<b>22,96 (9,3)</b>	<b>19,44 (1,7)</b>
51		21,11	<b>22,15 (12,5)</b>	20,69
73		<b>19,58 (2,7)</b>	<b>21,84 (13,7)</b>	<b>19,09 (3,4)</b>
87		23,5	<b>22,42 (11,5)</b>	19,96
102		20,14	<b>22,06 (12,9)</b>	20,45
113.1		<b>19,37 (3,8)</b>	<b>22,26 (12,1)</b>	20,91
119		<b>20 (0,6)</b>	<b>22,37 (11,7)</b>	<b>19,17 (3,0)</b>
137		<b>18,68 (7,2)</b>	<b>21,52 (15,0)</b>	20,64
146		<b>19,41 (3,6)</b>	<b>21,54 (14,9)</b>	<b>17,98 (9,1)</b>
154		21,4	<b>22,96 (9,3)</b>	20,19
178		<b>19,86 (1,3)</b>	<b>22,96 (9,3)</b>	20,87
3 C	CANA-DE- AÇÚCAR	<b>20,03 (0,5)</b>	26,46	<b>19,45 (1,6)</b>
8 C		<b>19,76 (1,8)</b>	<b>25,22 (0,4)</b>	20,47
12 C		20,21	26,92	20,96
20 C		20,96	<b>21,76 (14,1)</b>	<b>16,98 (14,1)</b>
21 C		<b>19,33 (4,0)</b>	26,11	19,95
22 C		<b>19,18 (4,7)</b>	<b>21,88 (13,6)</b>	<b>18,43 (6,8)</b>
23 C		<b>18,85 (6,4)</b>	<b>21,85 (13,7)</b>	<b>19,52 (1,3)</b>



27 C		<b>19,77 (1,8)</b>	<b>22,58 (10,8)</b>	20,49
28 C		20,32	<b>21,46 (15,2)</b>	<b>19,36 (2,1)</b>
32 C		22,62	<b>21,05 (16,9)</b>	20,2
33 C		21,71	<b>19,97 (21,1)</b>	<b>18,67 (5,6)</b>
36 C		20,39	<b>21,92 (13,4)</b>	<b>18,99 (3,9)</b>
38 C		21,33	<b>24,45 (3,4)</b>	20,59
42 C		<b>19,7 (2,1)</b>	<b>22,33 (11,8)</b>	22,08
48 C		20,8	<b>23,85 (5,8)</b>	<b>19,44 (1,7)</b>

Valores destacados em negrito indicam redução no crescimento micelial na presença das estirpes bacterianas. Valores entre parênteses indicam a porcentagem (%) de redução do crescimento micelial.

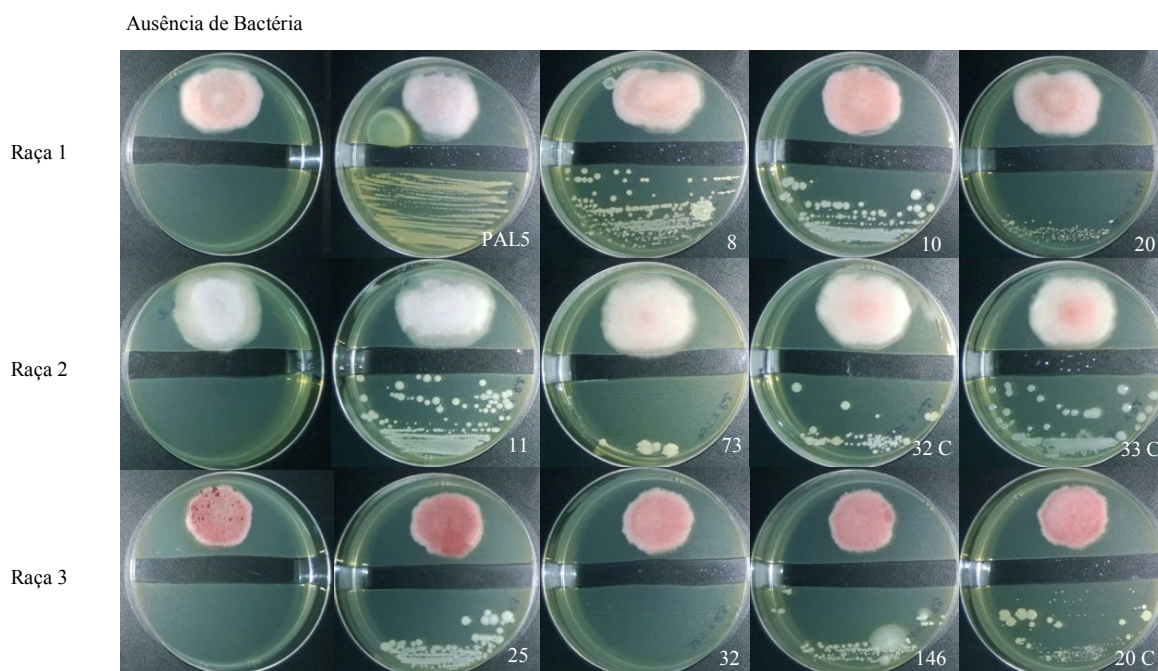


Figura 7. Exemplos de estirpes bacterianas submetidas ao teste de antagonismo *in vitro* para avaliação do potencial de produção de voláteis que inibem ou afetam o crescimento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Estirpes: PAL5 (controle), isolados 8, 10, 11, 20, 25, 32, 73 e 146 (isolados de tomateiro) e isolados 20C, 32C e 33C (isolados do líquido do apoplasto de plantas de cana-de-açúcar).

#### 5.4.2 Ação direta: método de estrias paralelas

A capacidade antagonista das 49 estirpes bacterianas avaliadas em placas, seguindo a metodologia de estrias paralelas (CORRALES et al., 2012) mostrou que 45 estirpes bacterianas reduziram o crescimento micelial da raça 1 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* em relação ao crescimento na ausência das estirpes bacterianas (Tabela 7). Em relação a raça 2 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 42 estirpes bacterianas reduziram o crescimento micelial enquanto que 48 estirpes bacterianas reduziram o crescimento micelial da raça 3 do fungo (Tabela 6). O resultado obtido nesse teste parece ser mais indicativo do antagonismo do que o teste de antagonismo pela

possível produção de voláteis, sugerindo que a capacidade antagonista das estirpes bacterianas estudadas ocorra mais pelo contato entre o fungo e as bactérias, pela liberação de compostos pelas bactérias no meio e/ou pela competição por espaço e nutrientes. Segundo Romeiro e Garcia (2009), o controle biológico por bactérias pode ocorrer através de mecanismos diretos como antibiose, competição por nutrientes, competição por nichos ecológicos, produção de sideróforos, predação e parasitismo, produção de enzimas, produção de compostos voláteis etc. Além disso, quando na área de cultivo, essas bactérias também agem através da indução de resistência das plantas. Esses mecanismos podem agir de forma conjunta no controle biológico de fitopatógenos. A figura 8 mostra o resultado obtido nos testes para algumas estirpes bacterianas.

As estirpes que se destacaram no teste de antagonismo pelo método de estrias foram: 113.1 (*B. cereus*), 154 (*B. cereus*), 178 (*B. cereus*) e estirpe PAL 5 (*G. diazotrophicus*), já que as mesmas foram capazes de reduzir o crescimento micelial das três raças de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. As estirpes 11 (*B. megaterium*), 16 (*B. megaterium*) e 137 (*B. cereus*) reduziram o crescimento micelial das raças 1 e 3 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Nascimento (2009) e Rocha e Moura (2013) também relataram a redução do crescimento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* por bactérias da espécie *B. cereus*. Kefi et al. (2015) selecionaram quatro estirpes de *Bacillus* em teste de antagonismo contra o fungo *Botrytis cinerea*, responsável pelo mofo cinzento em diversas culturas. As estirpes de *Bacillus* inibiram o crescimento do fungo em 27 a 53%. Em teste de antagonismo direto realizado por Maciel et al. (2014) foi constatado que a bactéria *B. subtilis* (UFV3918) e *Trichoderma* spp. foram eficientes no controle *in vitro* de *F. sambucinum*, além disso, a bactéria *B. subtilis* (UFV3918) foi promissora em teste *in vivo*, pois proporcionou maior vigor às plântulas de Pinus e reduziu as perdas ocasionadas pelo patógeno.

Tabela 7. Atividade antagonista das estirpes bacterianas as três raças de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* avaliada seis dias após a inoculação (método de ação direta).

Isolados	Isolado de plantas de:	Tamanho colônia fúngica (mm)		
		Raça 1	Raça 2	Raça 3
Controle (Sem bactéria)		45,25	40,63	55,97
PAL 5		<b>28,32 (37,4)</b>	<b>28,43 (30,0)</b>	<b>29,47 (47,3)</b>
S76		34,59 (23,5)	32,66 (19,6)	<b>29,91 (46,5)</b>
2	TOMATEIRO	41,58 (8,1)	40,25 (0,93)	44,11 (21,1)
8		44,55 (1,5)	40,28 (0,8)	45,59 (18,5)
10		35,35 (21,8)	35,97 (11,4)	<b>36,99 (33,9)</b>
11		<b>33,48 (26,0)</b>	35,59 (12,4)	<b>32,94 (41,1)</b>
12		43,37 (4,1)	37,2 (8,4)	<b>39,14 (30,0)</b>
15		37,03 (18,1)	38,46 (5,3)	<b>34,72 (37,9)</b>
16		<b>32,26 (28,7)</b>	36,98 (8,9)	<b>32,35 (42,2)</b>
17		35,02 (22,6)	33,19 (18,3)	<b>32,63 (41,7)</b>
18		34,52 (23,7)	37,72 (7,1)	<b>34,15 (38,9)</b>
20		42,23 (6,6)	38,56 (5,0)	51,06 (8,7)
21		35,65 (21,2)	33,68 (17,1)	<b>33,79 (39,6)</b>
22		37,5 (17,1)	31,69 (22,0)	<b>39,99 (28,5)</b>
24		35,15 (22,3)	36,09 (11,1)	<b>39,15 (30,0)</b>

25		35,92 (17,6)	38,94 (4,1)	<b>35,48 (36,6)</b>
26		35,13	34,49 (15,1)	<b>38,48 (31,2)</b>
27		37,25 (4,6)	39,94 (1,6)	<b>36,31 (35,1)</b>
28		45,66 (5,7)	41,19	49,3 (11,9)
29		43,16 (0,7)	39,38 (3,0)	56,54
32		42,63	40,43 (0,4)	52,61 (6,0)
33		44,92 (4,3)	41,7	54,79 (2,1)
40		46,93 (20,3)	40,6 (0,07)	51,92 (7,2)
48		43,26 (16,7)	41,25	51,03 (8,8)
51		36,03 (7,7)	38 (6,4)	<b>41,36 (26,1)</b>
73		37,69 (4,0)	36,7 (9,6)	<b>39,54 (29,3)</b>
87		41,73 (32,8)	38,89 (4,2)	<b>39,06 (30,2)</b>
102		43,42 (4,5)	40,25 (0,9)	52,12 (6,8)
113.1		<b>30,38 (26,4)</b>	<b>28,96 (28,7)</b>	<b>33,56 (40,0)</b>
119		43,21	41,57	50,43 (9,8)
137		<b>33,27 (29,0)</b>	33,09 (18,5)	<b>30,72 (45,1)</b>
146		45,37 (27,1)	43,51	49,82 (10,9)
154		<b>32,1 (29,0)</b>	<b>21,14 (47,9)</b>	<b>25,84 (53,8)</b>
178		<b>32,96 (27,1)</b>	<b>23,94 (41,0)</b>	<b>25,84 (53,8)</b>
3 C	CANA-DE- AÇÚCAR	38,34 (15,2)	33,84 (16,7)	<b>38,4 (31,3)</b>
8 C		37,41 (17,3)	36,58 (9,9)	<b>37,01 (33,8)</b>
12 C		37,53 (17,0)	32,71 (19,4)	<b>37,36 (33,2)</b>
20 C		39,61 (12,4)	37,11 (8,6)	<b>36,64 (34,5)</b>
21 C		<b>31,93 (29,4)</b>	34,17 (15,9)	43,58 (22,1)
22 C		35,41 (21,7)	37,5 (7,7)	<b>36,92 (34,0)</b>
23 C		37,5 (17,1)	36,06 (11,2)	<b>37,23 (33,4)</b>
27 C		38,3 (15,3)	36,45 (10,2)	<b>37,81 (32,4)</b>
28 C		36,57 (19,1)	34,2 (15,8)	<b>35,95 (35,7)</b>
32 C		44,42 (1,8)	38,65 (4,8)	<b>37,07 (33,7)</b>
33 C		36,36 (19,6)	36,28 (10,7)	<b>39,58 (29,2)</b>
36 C		38,9 (14,0)	33,84 (16,7)	44,05 (21,2)
38 C		44,83 (0,9)	41,83	46,87 (16,2)
42 C		45,49	42,09	54,97 (1,7)
48 C		39,21 (13,3)	39,35 (3,1)	49,55 (11,4)

Valores em negrito indicam inibição de crescimento micelial acima de 25% em relação ao controle. Valores entre parênteses indicam a porcentagem (%) de redução do crescimento micelial.

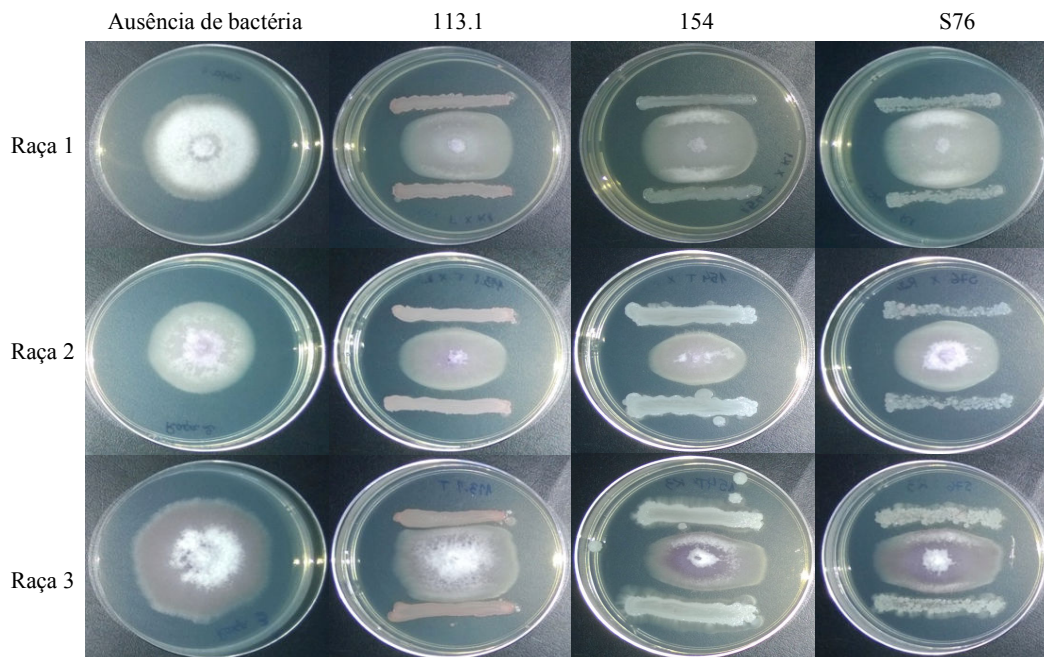


Figura 8. Teste de antagonismo *in vitro* pelo método de estrias paralelas mostrando o crescimento micelial das raças 1, 2 e 3 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* na presença e ausência das estirpes selecionadas.

## 5.5 Características Funcionais das Estirpes Bacterianas

### 5.5.1 Atividade celulolítica

Do total de isolados avaliados quanto a atividade celulolítica, 38 estirpes foram capazes de degradar a carboximetilcelulose (CMC) utilizado como fonte de carbono no meio de cultura, indicando que estas bactérias podem desempenhar um papel muito importante na biosfera por reciclar a celulose, que é o carboidrato mais produzido pelas plantas (BEGUIN & ANBERT, 1993), por acelerar a decomposição de matéria orgânica presente no solo. Além disso, a atividade celulolítica dos isolados bacterianos pode estar relacionada com a capacidade de penetração nas plantas, apresentando assim um importante papel ecológico na interação com plantas. Segundo Cho et al., (2007), bactérias endofíticas de diversas espécies, como *Bacillus* sp., *Pseudomonas*, *Paenibacillus* etc, possuem atividade celulolítica além de outras atividades enzimáticas, sendo este um indicativo de que bactérias endofíticas são capazes de colonizar tecidos internos de plantas devido suas atividades enzimáticas, respaldando o resultado encontrado neste estudo, em que 78% dos isolados bacterianos, obtidos de tecidos internos de plantas, apresentam atividade celulolítica.

Diversas espécies de *Bacillus* como o *B. cereus* (THAYER & DAVID, 1978), *B. subtilis* (ROBSON & CHAMBLISS, 1984), *B. licheniformis* (DHILLON et al., 1985) e *Bacillus* sp. KSM-330 (OZAKI & ITO, 1991) são conhecidas por secretar celulase. Segundo o estudo de Ladeira et al. (2015), um isolado de *Bacillus* sp. produziu celulase em meio líquido na presença de bagaço de cana-de-açúcar e em líquido proveniente da maceração de milho. A figura 9 mostra algumas estirpes que foram capazes de degradar o CMC presente no meio de cultura. O detalhamento dos resultados obtidos encontra-se no ANEXO II.



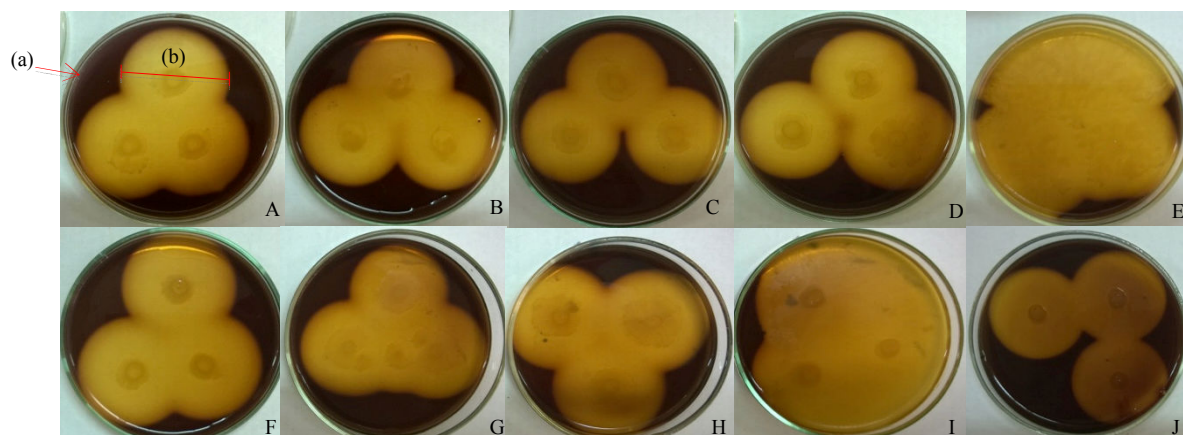


Figura 9. Estirpes bacterianas apresentando atividade celulolítica após tratamento das culturas crescidas em meio CMC com solução de iodine. (A) Estirpe S76; (B) Isolado 2; (C) Isolado 8; (D) Isolado 11; (E) Isolado 20; (F) Isolado 22; (G) Isolado 40; (H) Isolado 73; (I) Isolado 87; (J) Isolado 42 C. (a) Meio de cultura corado com iodine (parte em que não houve degradação de celulose); (b) Halo de degradação de celulose.

### 5.5.2 Produção de compostos indólicos

Foi verificado que todos os isolados de tomateiro foram capazes de produzir indols (32 isolados). No entanto, somente os isolados 18 (*B. megaterium*), 154 (*B. cereus*) e 178 (*B. cereus*) apresentaram produção significativa de auxina, produzindo cerca de  $18,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $30,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $18,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$  respectivamente (Figura 10) e o isolado 22 (*B. megaterium*) apresentou produção de auxina inferior a  $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (Figura 10)(ANEXO II).



Figura 10. Concentração de auxina produzida pelas estirpes bacterianas mais promissoras pertencentes as espécies *B. megaterium* (isolado 18), *B. thuringiensis* (isolado 22) e *B. cereus* (isolados 154 e 178) crescida em meio NB (Nutrient Broth) com triptofano.

Os isolados que apresentaram maior produção de auxina quando comparado aos demais são pertencentes as espécies *B. megaterium*, *B. thuringiensis* e *B. cereus*. A produção de auxina por estirpes pertencentes a espécie *B. thuringiensis* foi relatada por Raddadi et al. (2008). A produção de auxina por espécies tais como *B. megaterium*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. pumilus* e *B. cereus* foi relatada por Ali et al. (2009). Almoneafy et al. (2014) também relataram que bactérias das espécies *B. amyloliquefaciens* estirpe Am1 ( $44,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e estirpe D29

(51,54  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), *B. subtilis* estirpe D16 (53,21  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e a estirpe H8 de *B. methylotrophicus* (59,56 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) também produziram auxina. Além disso, os autores observaram correlação positiva entre a quantidade AIA produzida e o peso fresco e seco das plantas de tomate inoculadas com as bactérias. O detalhamento dos resultados obtidos para todas as estirpes encontra-se no ANEXO III.

### 5.5.3 Solubilização de fosfato inorgânico e zinco *in vitro*

A capacidade das bactérias em solubilizar fosfato inorgânico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) foi verificado para 20 isolados de tomateiro, enquanto que 6 isolados foram capazes de solubilizar o zinco ( $\text{ZnO}$ ). As estirpes PAL 5 (*G. diazotrophicus*) e S76 (*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*) foram capazes de solubilizar tanto fosfato quanto zinco. Além disso, 4 isolados originário do líquido do apoplasto de plantas de cana-de-açúcar apresentam capacidade de solubilizar fosfato inorgânico *in vitro* e 13 isolados apresentam capacidade de solubilizar óxido de zinco (MELO et al., submetido). A figura 11 e 12 ilustram a capacidade de solubilização de fosfato inorgânico e óxido de zinco *in vitro*, respectivamente. O detalhamento dos resultados obtidos para todas as estirpes encontra-se no ANEXO III.

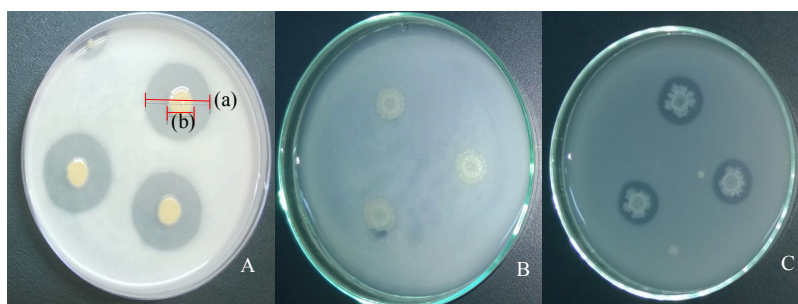


Figura 11. Estirpes bacterianas solubilizadoras de fosfato inorgânico em meio NBRIP contendo  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  como fonte de fósforo. (A) Estirpe PAL 5 (controle); (B) Isolado 11; (C) Isolado 25. (a) Halo de solubilização de fosfato inorgânico; (b) Colônia bacteriana.

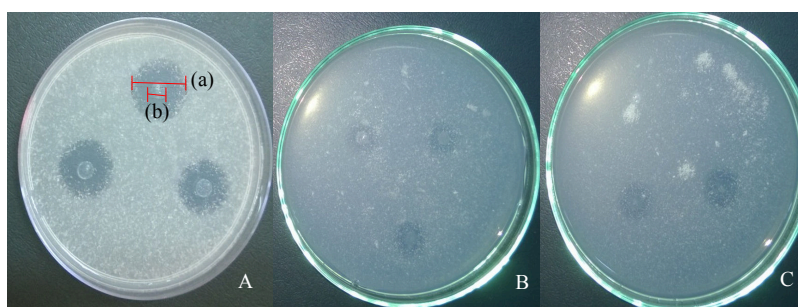


Figura 12. Estirpes bacterianas solubilizadoras de zinco em meio NBRIP contendo  $\text{ZnO}$  como fonte de zinco. (A) Estirpe PAL 5 (controle); (B) Isolado 2; (C) Isolado 20. (a) Halo de solubilização de zinco; (b) Colônia bacteriana.

As bactérias que solubilizaram fosfato pertencem as espécies *B. thuringiensis*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. stratosphericus*, *P. barcinonensis*, *P. taichungensis* e um isolado não identificado filogeneticamente. Marra et al. (2012) e Rodríguez e Fraga (1999) também relataram que bactérias do gênero *Bacillus* e *Paenibacillus* são capazes de solubilizar fosfato inorgânico. Da mesma forma, Chen et al. (2006), Jorquera et al. (2008) e Wang et al. (2014) relataram que

estirpes pertencentes as espécies *B. amyloliquefaciens*, *B. megaterium*, *B. thuringiensis* são capazes de solubilizar fosfato inorgânico. Almoneafy et al. (2014) relataram que três estirpes do gênero *Bacillus* (*B. amyloliquefaciens* D29, *B. amyloliquefaciens* Am1 e *B. methylotrophicus* H8) foram capazes de solubilizar fosfato inorgânico. No entanto, cabe ressaltar que a capacidade em solubilizar fosfato inorgânico seria mais efetiva em solos com deficiência do nutriente em sua forma disponível para as plantas.

As bactérias que solubilizaram óxido de zinco pertencem as espécies *B. thuringiensis*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *P. taichungensis* e *B. subtilis*. Segundo Saranavan et al. (2003) bactérias do gênero *Bacillus* são capazes de solubilizar zinco *in vitro*. A capacidade de bactérias deste gênero solubilizar zinco também foi relatada por Ramesh et al. (2014) e Sharma et al. (2012). Segundo Saranavan et al. (2003) bactérias do gênero *Pseudomonas* sp. apresentam maior potencial de solubilização de zinco nas formas de carbonato de zinco e óxido de zinco, já bactérias do gênero *Bacillus* apresentam maior potencial para solubilizar zinco na forma de sulfeto de zinco. Como algumas estirpes estudadas não solubilizaram zinco, essa ausência na capacidade de solubilizar este micronutriente deve ser investigada, alterando a fonte de zinco acrescido no meio de cultura, verificando assim se a forma do micronutriente influencia na capacidade das bactérias em solubilizá-lo. Da mesma forma que a capacidade de solubilizar fosfato, a capacidade das bactérias solubilizarem zinco é mais interessante em solos com deficiência de zinco em sua forma disponível para as plantas.

#### **5.5.4 Atividade proteolítica**

Cerca de 35 estirpes foram capazes de degradar a proteína do leite (atividade proteolítica) presente no meio de cultivo. A figura 13 mostra algumas estirpes que degradaram a proteína do leite presente no meio de cultura pela produção de protease. O detalhamento dos resultados obtidos encontra-se no ANEXO III. Segundo Pant et al. (2015) bactérias do gênero *Bacillus* são os principais produtores de proteases e as indústrias usam com frequência *B. subtilis* para produção em larga escala de proteases e outras enzimas. Basurto-Cadena et al. (2011) relataram a produção de proteases *in vitro* por uma estirpe de *B. subtilis* e também avaliaram o controle biológico desta estirpe contra fungos de importância econômica em casa de vegetação. Os autores constataram que a produção de protease pode ter implicado na atividade antagonística contra os fungos e bactérias patogênicas.

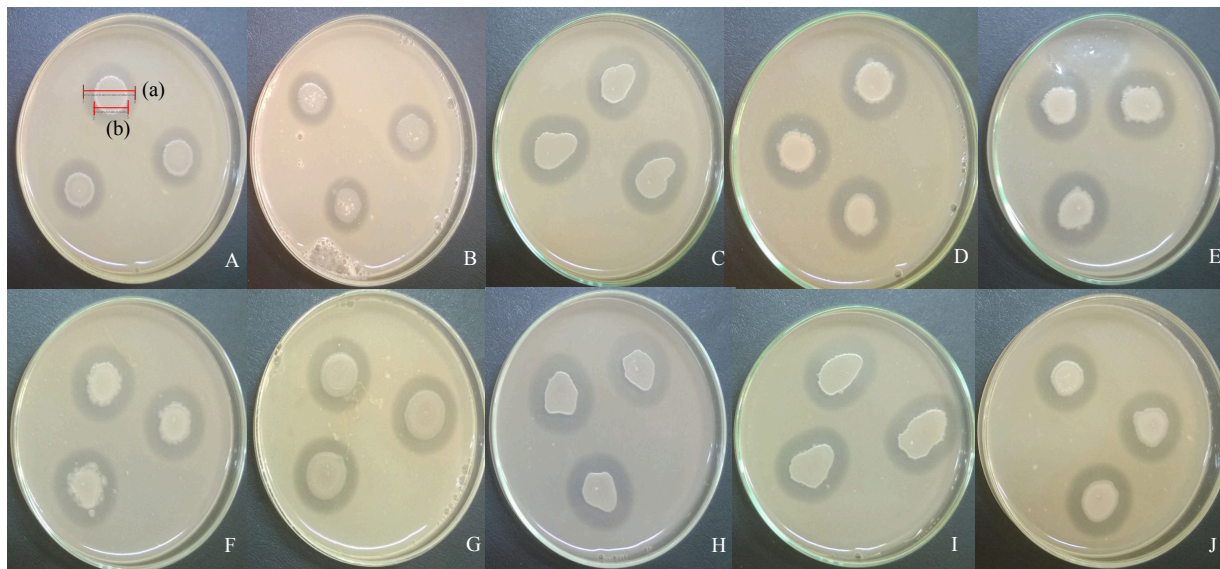


Figura 13. Exemplos de estirpes bacterianas com atividade proteolítica. (A) Estirpe PAL 5 (controle); (B) Estirpe S76; (C) Isolado 17; (D) Isolado 25; (E) Isolado 40; (F) Isolado 51; (G) Isolado 146; (H) Isolado 154; (I) Isolado 178; (J) Isolado 38 C. (a) Halo de degradação da proteína do leite; (b) Colônia bacteriana.

O resultado sumarizado das características funcionais das estirpes estudadas tais como atividade proteolítica e celulolítica, capacidade de solubilização de fosfato inorgânico e óxido de zinco e capacidade de produção de indols está apresentado na tabela 8. Com base na avaliação das características funcionais das estirpes bacterianas estudadas pode-se observar que 72% das estirpes possuem atividade proteolítica, 78% possuem atividade celulolítica, 48% solubilizam fosfato inorgânico, 42% solubilizam óxido de zinco e 40,8% são capazes de produzir indols. Apenas os isolados 154 (*B. cereus*), 42 C (*P. taichungensis*) e a estirpe S76 (*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*) possuem todas as características funcionais avaliadas. Por outro lado, 6 isolados (137, 178, 27 C, 28 C, 32 C e 33 C) apresentam quatro das cinco características funcionais avaliadas e 20 estirpes bacterianas (PAL 5, 2, 8, 15, 17, 20, 21, 22, 24, 25, 28, 29, 32, 51, 87, 113.1, 3 C, 8 C, 36 C e 48 C) possuem pelo menos três características funcionais. Os demais isolados apresentam duas características funcionais, exceto os isolados 16 (*B. megaterium*) e o isolado 33 (*B. stratosphericus*) que apresentaram apenas atividades celulolítica e proteolítica, respectivamente.



Tabela 8. Resultado sumarizado das características funcionais das estirpes bacterianas

Isolado	Atividades funcionais				
	Protease	Celulase	Fosfato	Zinco	Indols
Sp245 <sup>a</sup>	+	+	-	-	+
PAL 5	+	-	+	+	na
S76	+	+	+	+	+
2	+	+	-	+	-
8	+	+	+	-	-
10	-	+	+	-	-
11	-	+	+	-	-
12	+	+	-	-	-
15	+	+	+	-	-
16	-	+	-	-	-
17	+	+	+	-	-
18	-	+	-	-	+
20	-	+	+	+	-
21	+	+	+	-	-
22	+	+	-	-	+
24	+	+	+	-	-
25	+	+	+	-	-
26	+	+	-	-	-
27	+	-	+	-	-
28	-	+	+	+	-
29	+	+	+	-	-
32	+	+	+	-	-
33	+	-	-	-	-
40	+	+	-	-	-
48	+	+	-	-	-
51	+	+	-	+	-
73	+	+	-	-	-
87	+	+	+	-	-
102	+	+	-	-	-
113.1	+	+	+	-	-
119	+	+	-	-	-
137	+	+	+	+	-
146	+	+	-	-	-
154	+	+	+	+	+
178	+	+	+	-	+
3 C	-	-	+*	+*	+*
8 C	+	+	_*	_*	+*
12 C	-	-	_*	+*	+*
20 C	-	-	_*	+*	+*

21 C	-	+	_*	_*	+*
22 C	-	-	_*	+*	+*
23 C	-	-	_*	+*	+*
27 C	+	+	_*	+*	+*
28 C	+	+	_*	+*	+*
32 C	+	+	_*	+*	+*
33 C	-	+	+*	+*	+*
36 C	-	-	+*	+*	+*
38 C	+	-	_*	+*	_*
42 C	+	+	+*	+*	+*
48 C	+	-	_*	+*	+*

<sup>a</sup>*Azospirillum brasilense* estirpe Sp245, usada nos testes para caracterização da mesma. na - estirpes não avaliadas nos testes.

\* Resultado obtido por Melo et al., submetido (Tabela 2)

Símbolo: (+) positivo e (-) negativo para a característica funcional.

### 5.6 Seleção de Genótipo de Tomateiro Suscetível a *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*

A inoculação das três raças de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* em tomateiro (híbrido Débora Plus, híbrido Santa Clara Miss Brasil, variedade Perinha e variedade Carolina) mostrou que a variedade Perinha apresenta maior suscetibilidade às três raças de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* visto que as plantas encontravam-se totalmente murchas e algumas plantas estavam tombadas e com todo o sistema vascular escuro aos 15 dias após a inoculação (Figura 14). Em adição, as raças 1 e 3 causaram maior severidade nas variedades Perinha e Carolina enquanto que as plantas do híbrido Santa Clara Miss Brasil apresentaram coloração escura no tratamento com as raças 2 e 3 do fungo. No entanto, ao colocar fragmentos das plantas do híbrido Santa Clara Miss Brasil crescidas na presença da raça 1 em placas de Petri contendo meio BDA (Batata-Dextrose-Agar) foi observado o crescimento do fungo, indicando que o mesmo estava presente nas plantas, porém os sintomas da doença ainda não tinham aparecido nas plantas. O híbrido Débora Plus não apresentou doença quando crescida em substrato contendo as três raças do fungo e da mesma forma não houve crescimento do fungo quando fragmentos da planta foram colocados em meio BDA (Tabela 9).

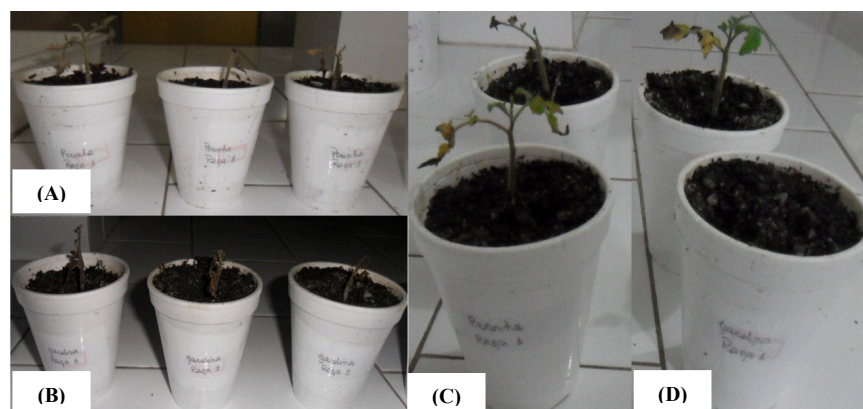


Figura 14. Aspecto visual de plantas de tomateiro 15 dias após o transplante para copos contendo substrato contaminado com as raças 1 e 3 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. (A) raça 3 (cultivar Perinha) (B) raça 3 (cultivar Carolina) (C) raça 1 (cultivar Perinha) (D) raça 1 (cultivar Carolina).

Tabela 9. Extensão da colonização das raças 1, 2 e 3 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* nos genótipos de tomateiro Carolina, Débora Plus, Perinha e Santa Clara Miss Brasil avaliadas 15 dias após o transplante para substrato contaminado

Tratamentos	Extensão de Colonização (%)			
	Carolina	Débora	Perinha	Santa Clara
Controle (substrato não contaminado)	0Ab	0Aa	0Ab	0Ab
Raça 1	87,8Aa	0Ba	79,8Aa	0Bb
Raça 2	17,2Ab	0Aa	34,9Ab	20Aab
Raça 3	83,1Aa	0Ba	100,0Aa	59,8Aa
CV(%)	59,05			

Médias seguidas de letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados obtidos neste ensaio contrastam com as informações fornecidas pelos produtores das sementes. Esperava-se que a variedade Carolina fosse resistente as raças 1 e 2 do fungo, mas as plantas dessa variedade foram suscetíveis a raça 1 e também apresentaram pouca resistência a raça 2. Em relação ao híbrido Santa Clara Miss Brasil, não foi observado sintoma de colonização da raça 1 na planta, mas o mesmo apresentou crescimento em meio de cultura quando foi inoculado fragmentos da planta, sugerindo que o fungo já havia colonizado os tecidos da planta, mas não foi capaz de causar doença. A presença do fungo não inviabiliza a resistência desse híbrido, mostrando que o híbrido Santa Clara Miss Brasil é resistente a raça 1 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. As raças do fungo são separadas de acordo com a habilidade que o fungo apresenta em infectar e causar doença em diversas cultivares de tomateiro que possuem genes em diferentes *loci* de resistência (SOUZA et al., 2010). Essa característica genética pode explicar os resultados encontrados neste estudo onde alguns genótipos apresentaram maior suscetibilidade a determinada raça do fungo do que outra.

Com base nos resultados obtidos no teste para seleção de genótipos suscetíveis as três raças de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* a variedade Perinha foi escolhida para os testes de

biocontrole uma vez que a mesma apresentou suscetibilidade as três raças do fungo.

### **5.7 Efeito da Inoculação de Bactérias em Tomateiro da Variedade Perinha e Avaliação da Proteção as Raças de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici***

A análise das plantas coletadas no experimento com a raça 1 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* mostrou que 28 isolados bacterianos proporcionaram uma menor infecção do fungo quando comparadas as plantas do tratamento testemunha, sem a inoculação de bactérias e crescidas em substrato contaminado com o fungo (Tabela 10). Em adição, 8 estirpes promoveram um maior crescimento nas plantas de tomate em substrato não contaminado enquanto que 17 estirpes promoveram maior crescimento nas plantas de tomate em substrato contaminado com o fungo (Tabela 10).

Tabela 10. Análise do comprimento das hastes e porcentagem de infecção de plantas de tomateiro da variedade Perinha crescidas em substrato infestado com a raça 1 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*

T <sup>1</sup>	Isolados	Origem	Comprimento das Hastes		Porcentagem de Infecção (%)
			Substrato não contaminado	Substrato contaminado com <i>Fol.</i> Raça 1	Substrato contaminado com <i>Fol.</i> Raça 1
1*	controle	-	14.48 a5	7.60 a1	23,04
2	S76	-	<b>19.43 a6</b>	10.77 a2	25,46
3	PAL5	-	<b>16.59 a6</b>	12.70 a3	<b>14,53</b>
4	2	Tomateiro	<b>18.06 a6</b>	12.23 a3	33,70
5	8		11.89 a4	11.56 a3	34,68
6	10		9.11 a3	10.11 a2	34,38
7	11		12.34 a4	13.18 a3	33,18
8	12		7.48 a2	<b>18.33 a5</b>	<b>19,19</b>
9	15		6.04 a1	<b>16.87 a5</b>	40,50
10	16		7.38 a2	<b>17.11 a5</b>	24,22
11	17		10.87 a3	11.65 a3	<b>21,45</b>
12	18		<b>14.99 a5</b>	11.56 a3	27,10
13	20		9.53 a3	12.94 a3	23,29
14	21		8.72 a2	12.57 a3	36,16
15	22		4.54 a1	7.90 a1	<b>10,27</b>
16	24		12.45 a4	<b>14.13 a4</b>	<b>13,26</b>
17	25		<b>15.26 a5</b>	<b>14.86 a4</b>	38,45
18	26		<b>14.69 a5</b>	<b>15.16 a4</b>	39,28
19	27		<b>14.71 a5</b>	<b>15.62 a4</b>	32,31
20	28		11.78 a4	<b>15.12 a4</b>	39,85
21	29		12.37 a4	11.75 a3	<b>1,73</b>
22	32		13.32 a4	11.16 a3	<b>20,84</b>
23	33		10.71 a3	9.62 a2	<b>6,20</b>
24	32 C	Cana-de-açúcar	12.03 a4	10.51 a2	<b>7,57</b>
25	20 C		12.37 a4	10.48 a2	<b>9,69</b>
26	23 C		11.20 a3	13.76 a3	25,25
27	22 C		11.34 a3	12.84 a3	<b>11,50</b>
28	3 C		11.94 a4	<b>15.13 a4</b>	30,53
29	42 C		9.96 a3	12.16 a3	24,51
30	36 C		11.24 a3	<b>14.88 a4</b>	<b>17,52</b>
31	12 C		13.26 a4	<b>15.31 a4</b>	<b>17,12</b>
32	28 C		<b>14.60 a5</b>	10.41 a2	28,96
33	33 C		13.95 a5	13.60 a3	<b>17,66</b>
34	48 C		9.67 a3	13.06 a3	<b>22,08</b>
35	21 C		12.11 a4	12.38 a3	<b>16,91</b>
36	38 C		7.35 a2	12.35 a3	<b>10,49</b>

37	27 C		9.36 a3	11.64 a3	25,14
38	8 C	—————	7.88 a2	<b>18.84 a5</b>	25,03
39	40		8.37 a2	<b>18.16 a5</b>	<b>22,68</b>
40	48		8.45 a2	<b>17.35 a5</b>	<b>16,90</b>
41	51		7.81 a2	<b>17.45 a5</b>	<b>21,73</b>
42	73		10.85 a3	11.66 a3	<b>9,78</b>
43	87		10.05 a3	<b>14.67 a4</b>	<b>14,23</b>
44	102	Tomateiro	9.21 a3	12.39 a3	<b>16,94</b>
45	113.1		10.04 a3	<b>14.55 a4</b>	<b>12,82</b>
46	119		10.23 a3	12.52 a3	25,15
47	137		12.85 a4	13.41 a3	<b>21,87</b>
48	146		11.19 a3	11.33 a3	<b>14,14</b>
49	154		13.16 a4	11.53 a3	<b>13,68</b>
50	178		13.70 a5	10.62 a2	<b>15,63</b>

CV (%) = 24,46

Teste de Scott-Knott (1974) a 5% de significância

<sup>1</sup> Tratamentos do experimento com raça 1 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*

\* Testemunha: sem inoculação de bactéria

As maiores médias quando comparadas com a testemunha estão destacadas em negrito

Baseando-se nos resultados do ensaio realizado com a raça 1 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* foram selecionadas algumas bactérias para os ensaios com as raças 2 e 3 do fungo. Estas bactérias foram selecionadas de acordo com a capacidade de induzirem resistência e/ou promoverem o crescimento das plantas de tomateiro variedade Perinha na presença do fungo (Tabela 11).

Tabela 11. Características de biocontrole e promoção de crescimento das bactérias selecionadas no ensaio com a raça 1 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* para os ensaios de antagonismo contra as raças 2 e 3 do fungo

Tratamentos no ensaio com raça 1	Estirpes	Características observadas nas plantas do ensaio com raça 1	
2	S76	Promoção de crescimento	
3	PAL5	Promoção de crescimento	Na ausência do fungo
4	2	Promoção de crescimento	
8	12	Promoção de crescimento / Infecção baixa	
9	15	Promoção de crescimento	Na presença do fungo
10	16	Promoção de crescimento	
15	22	Infecção baixa	
16	24	Promoção de crescimento / Infecção baixa	
17	25	Promoção de crescimento	
18	26	Promoção de crescimento	Na presença e ausência do fungo
19	27	Promoção de crescimento	
20	28	Promoção de crescimento	
21	29	Infecção baixa	
23	33	Infecção baixa	
24	32 C	Infecção baixa	
25	20 C	Infecção baixa	
31	12 C	Promoção de crescimento / Infecção baixa	
38	8 C	Promoção de crescimento	
39	40	Promoção de crescimento / Infecção baixa	
40	48	Promoção de crescimento / Infecção baixa	Na presença do fungo
41	51	Promoção de crescimento / Infecção baixa	
42	73	Infecção baixa	
43	87	Promoção de crescimento / Infecção baixa	
45	113.1	Promoção de crescimento / Infecção baixa	

A análise das plantas coletadas no experimento com a raça 2 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* mostrou que 13 isolados bacterianos proporcionaram uma maior proteção (menor infecção) ao fungo quando comparadas as plantas do tratamento testemunha, sem a inoculação de bactérias e crescidas em substrato contaminado com o fungo. Em adição, 7 estirpes promoveram

um maior crescimento de hastes de plantas de tomateiro em substrato não contaminado enquanto que 10 estirpes promoveram maior crescimento nas plantas de tomateiro em substrato contaminado com o fungo (Tabela 12).

A análise das plantas coletadas no experimento com a raça 3 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* mostrou que 12 isolados bacterianos proporcionaram uma maior proteção (menor infecção) ao fungo quando comparadas as plantas do tratamento testemunha (sem a inoculação de bactérias e crescidas em substrato contaminado com o fungo) e 6 estirpes promoveram um maior crescimento das hastes de plantas de tomateiro em substrato não contaminado enquanto que apenas 3 estirpes promoveram maior crescimento das hastes de plantas de tomateiro em substrato contaminado com o fungo (Tabela 13).



Tabela 12. Análise do comprimento das hastes e porcentagem de infecção de plantas de tomateiro da variedade Perinha crescidas em substrato infestado com a raça 2 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*

T <sup>1</sup>	Isolados	Origem	Comprimento das Hastes		Porcentagem de Infecção (%)	
			Substrato não contaminado	Substrato contaminado com <i>Fol.</i> Raça 2	Substrato contaminado com <i>Fol.</i> Raça 2	
1*	controle	-	10.49 a2	11.51 a3	2,78	
2	S76	-	10.37 a2	<b>12.44 a3</b>	5,19	
3	PAL 5	-	<b>12.61 a3</b>	<b>13.65 a3</b>	<b>2,64</b>	
4	2	Tomateiro	<b>12.61 a3</b>	<b>15.73 a4</b>	<b>1,88</b>	
5	12		<b>13.52 a3</b>	<b>15.72 a4</b>	7,35	
6	15		<b>17.00 a4</b>	<b>16.81 a4</b>	<b>0</b>	
7	16		<b>13.16 a3</b>	10.45 a2	8,16	
8	22		<b>10.68 a2</b>	<b>17.57 a4</b>	<b>0</b>	
9	24		9.30 a2	<b>16.52 a4</b>	<b>0</b>	
10	25		8.72 a2	8.90 a2	3,91	
11	26		9.58 a2	6.75 a1	<b>0</b>	
12	27		9.37 a2	6.18 a1	22,50	
13	28		9.76 a2	7.46 a1	<b>1,35</b>	
14	29		10.35 a2	9.22 a2	<b>0,69</b>	
15	33		8.80 a2	10.79 a2	<b>0</b>	
16	32 C		Cana-de-açúcar	<b>10.94 a2</b>	10.11 a2	<b>0</b>
17	20 C			4.83 a1	<b>12.86 a3</b>	<b>0,97</b>
18	12 C			5.67 a1	<b>13.28 a3</b>	<b>1,78</b>
19	8 C	5.35 a1		<b>12.08 a3</b>	6,02	
20	40	Tomateiro	5.30 a1	7.86 a2	10,11	
21	48		5.56 a1	6.59 a1	9,63	
22	51		5.41 a1	8.70 a2	<b>0</b>	
23	73		6.45 a1	8.52 a2	77,30	
24	87		5.56 a1	5.66 a1	12,27	
25	113.1		6.26 a1	6.61 a1	19,80	

CV (%) = 27,93

Teste de Scott-Knott (1974) a 5% de significância

<sup>1</sup> Tratamentos do experimento com raça 2 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*

\* Testemunha: sem inoculação de bactéria

As maiores médias quando comparadas com a testemunha estão destacadas em negrito

Tabela 13. Análise do comprimento das hastes e porcentagem de infecção de plantas de tomateiro da variedade Perinha crescidas em substrato infestado com a raça 3 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*

T <sup>1</sup>	Isolados	Origem	Comprimento das Hastes		Porcentagem de Infecção (%)	
			Substrato não contaminado	Substrato contaminado com <i>Fol.</i> Raça 3	Substrato contaminado com <i>Fol.</i> Raça 3	
1*	controle	-	8.62 a3	8.27 a3	49,42	
2	S76	-	9.89 a3	9.44 a3	<b>44,04</b>	
3	PAL 5	-	<b>13.05 a4</b>	9.18 a3	52,82	
4	2	Tomateiro	<b>15.06 a5</b>	<b>12.73 a4</b>	<b>26,62</b>	
5	12		<b>14.17 a5</b>	<b>11.78 a4</b>	<b>32,98</b>	
6	15		<b>16.02 a5</b>	<b>13.11 a4</b>	<b>32,13</b>	
7	16		<b>15.46 a5</b>	6.32 a2	95,00	
8	22		<b>12.47 a4</b>	5.55 a2	94,20	
9	24		9.83 a3	4.62 a2	93,50	
10	25		8.93 a3	5.72 a2	98,00	
11	26		6.34 a2	2.50 a1	85,67	
12	27		7.97 a3	5.12 a2	<b>26,03</b>	
13	28		8.55 a3	2.36 a1	95,00	
14	29		9.48 a3	5.83 a2	<b>18,72</b>	
15	33		10.28 a3	0.77 a1	93,00	
16	32 C		Cana-de-açúcar	10.38 a3	0.70 a1	76,90
17	20 C			10.07 a3	0.91 a1	87,20
18	12 C			9.63 a3	1.36 a1	93,40
19	8 C	10.76 a3		1.51 a1	98,00	
20	40	Tomateiro	1.00 a1	8.33 a3	<b>22,54</b>	
21	48		1.55 a1	9.07 a3	<b>32,75</b>	
22	51		11.02 a3	9.09 a3	<b>32,45</b>	
23	73		11.02 a3	9.08 a3	<b>33,30</b>	
24	87		11.01 a3	9.00 a3	<b>32,40</b>	
25	113.1		0.80 a1	9.54 a3	<b>14,93</b>	

CV (%) = 27,93

Teste de Scott-Knott (1974) a 5% de significância

<sup>1</sup> Tratamentos do experimento com raça 3 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*

\* Testemunha: sem inoculação de bactéria

As maiores médias quando comparadas com a testemunha estão destacadas em negrito

A avaliação quanto ao incremento de massa fresca mostrou que quatro isolados bacterianos proporcionaram maior incremento de massa fresca nos tomateiros crescidos em substrato não contaminado com a raça 1 do fungo em relação as plantas não inoculadas. Já em substrato contaminado com a raça 1 do fungo foi observado um maior incremento de massa fresca em relação a testemunha para 17 isolados bacterianos (Tabela 14). Em relação ao incremento de massa fresca no experimento com a raça 2, foi observado que 5 isolados promoveram maior incremento de massa fresca comparado ao controle na ausência do fungo e 9 isolados promoveram maior incremento de massa fresca na presença da raça 2 do fungo (Tabela 14). Já no experimento com a raça 3 do fungo, 14 isolados proporcionaram maior incremento de massa fresca em substrato não contaminado com o fungo e 4 isolados foram capazes de proporcionar maior incremento de massa fresca na presença da raça 3 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Tabela 14).

Tabela 14. Análise de acúmulo de massa fresca de tomateiros crescidos na presença e ausência das raças 1, 2 e 3 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*

I <sup>1</sup>	Origem	Massa fresca da parte aérea (g)					
		Fol. Raça 1		Fol. Raça 2		Fol. Raça 3	
		Inoculação					
		Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com
T <sup>2</sup>	-	<b>3.176 a2</b>	<b>0.873 a1</b>	2.054 a3	2.182 a3	1.305 a2	2.165 a4
S76	-	<b>4.536 a2</b>	1.766 a1	1.853 a3	1.861 a3	1.240 a2	<b>2.281 a4</b>
PAL5	-	3.046 a2	2.172 a1	<b>2.575 a3</b>	<b>2.300 a3</b>	<b>1.875 a3</b>	1.711 a3
2		<b>4.117 a2</b>	2.086 a1	<b>2.250 a3</b>	<b>2.609 a3</b>	<b>2.011 a3</b>	<b>2.734 a4</b>
8		1.625 a1	2.066 a1	*	*	*	*
10		2.003 a1	1.725 a1	*	*	*	*
11		3.109 a2	2.124 a1	*	*	*	*
12		0.993 a1	<b>3.778 a2</b>	<b>2.460 a3</b>	<b>2.765 a3</b>	<b>2.186 a4</b>	<b>2.419 a4</b>
15		0.649 a1	<b>3.794 a2</b>	<b>4.034 a4</b>	<b>3.421 a4</b>	<b>2.266 a4</b>	<b>2.799 a4</b>
16		0.938 a1	<b>3.333 a2</b>	2.031 a3	1.797 a3	<b>2.876 a4</b>	1.298 a2
17		1.620 a1	1.599 a1	*	*	*	*
18		<b>3.772 a2</b>	1.625 a1	*	*	*	*
20	Tomateiro	1.451 a1	2.216 a1	*	*	*	*
21		2.046 a1	2.576 a1	*	*	*	*
22		0.908 a1	1.005 a1	1.875 a3	<b>4.161 a4</b>	<b>1.762 a3</b>	1.030 a2
24		1.857 a1	2.692 a1	1.398 a2	<b>4.139 a4</b>	<b>1.372 a2</b>	0.629 a1
25		<b>3.210 a2</b>	<b>3.155 a2</b>	1.527 a2	1.530 a2	<b>1.523 a3</b>	1.256 a2
26		2.692 a2	<b>2.951 a2</b>	1.807 a3	0.786 a1	0.814 a2	0.563 a1
27		2.748 a2	2.579 a1	1.457 a2	0.624 a1	1.036 a2	0.796 a2
28		1.896 a1	<b>3.119 a2</b>	2.044 a3	0.830 a1	1.171 a2	0.304 a1
29		2.722 a2	1.958 a1	1.940 a3	1.157 a2	1.211 a2	0.754 a2
32		2.822 a2	1.787 a1	*	*	*	*
33		1.442 a1	1.402 a1	1.571 a2	1.628 a2	1.228 a2	0.113 a1

32 C		1.753 a1	1.941 a1	<b>2.613 a3</b>	1.294 a2	<b>1.370 a2</b>	0.108 a1
20 C		2.165 a1	1.862 a1	0.552 a1	<b>2.199 a3</b>	<b>1.370 a2</b>	0.120 a1
23 C		1.654 a1	2.810 a1	*	*	*	*
22 C		2.020 a1	2.136 a1	*	*	*	*
3 C		2.069 a1	<b>3.439 a2</b>	*	*	*	*
42 C		1.350 a1	2.156 a1	*	*	*	*
36 C		2.144 a1	<b>3.453 a2</b>	*	*	*	*
12 C	Cana-de-açúcar	3.090 a2	<b>3.302 a2</b>	0.652 a1	<b>2.354 a3</b>	1.269 a2	0.158 a1
28 C		3.135 a2	1.830 a1	*	*	*	*
33 C		2.749 a2	2.212 a1	*	*	*	*
48 C		1.661 a1	2.678 a1	*	*	*	*
21 C		2.870 a2	2.707 a1	*	*	*	*
38 C		0.930 a1	2.689 a1	*	*	*	*
27 C		1.608 a1	2.502 a1	*	*	*	*
8 C		1.119 a1	<b>4.976 a2</b>	0.546 a1	<b>2.615 a3</b>	<b>1.497 a3</b>	0.225 a1
40		1.218 a1	<b>3.998 a2</b>	0.519 a1	0.913 a1	0.154 a1	1.489 a3
48		1.182 a1	<b>4.541 a2</b>	0.504 a1	0.701 a1	0.176 a1	1.200 a2
51		0.993 a1	<b>4.048 a2</b>	0.563 a1	1.363 a2	<b>1.945 a3</b>	1.356 a2
73		2.539 a2	2.341 a1	0.645 a1	1.563 a2	<b>1.995 a3</b>	1.111 a2
87		1.441 a1	<b>3.585 a2</b>	0.507 a1	0.727 a1	<b>2.344 a4</b>	1.362 a2
102		1.441 a1	2.351 a1	*	*	*	*
113.1	Tomateiro	1.956 a1	<b>3.673 a2</b>	0.646 a1	1.167 a2	0.096 a1	1.572 a3
119		1.872 a1	<b>3.081 a2</b>	*	*	*	*
137		2.887 a2	<b>3.008 a2</b>	*	*	*	*
146		2.272 a1	2.401 a1	*	*	*	*
154		2.705 a2	2.123 a1	*	*	*	*
178		2.635 a2	2.432 a1	*	*	*	*
		CV (%) = 60,74		CV (%) = 56,21		CV (%) = 56,21	

Teste de Scott-Knott (1974) a 5% de significância

<sup>1</sup> - Isolados bacterianos

<sup>2</sup> - Testemunha: Sem inoculação de bactéria

\* Isolados não selecionados para teste com raça 2 e 3 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*

As maiores médias estão destacadas em negrito

Com base nos resultados obtidos nos experimentos em casa de vegetação com as três raças de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* foram selecionadas alguns isolados bacterianos com potencial de controle as raças 1, 2 e 3 do fungo e/ou de promoção de crescimento. Os isolados bacterianos selecionados e suas características funcionais estão descritas na tabela 15.

Tabela 15. Bactérias selecionadas de acordo com características funcionais, promoção de crescimento e controle das raças de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Raça do fungo	Isolado	Similaridade com banco de dados (16S RNAr)	Indols <sup>1</sup>	Pi <sup>2</sup>	Zn <sup>3</sup>	Celulase <sup>4</sup>	Protease <sup>5</sup>	Antagonismo <i>in vitro</i> <sup>6</sup>	Antagonismo na planta <sup>7</sup>	Promoção de crescimento <sup>8</sup>
Raça 1	29	<i>Bacillus stratosphericus</i>	-	+	-	+	+	+	98,27	54,6
	33	<i>Bacillus stratosphericus</i>	-	-	-	-	+	+	93,25	26,57
Raça 2	15	<i>Bacillus megaterium</i>	-	+	-	+	+	+	100	46,04
	22	<i>Bacillus thuringiensis</i>	+	-	-	+	+	+	100	52,64
Raça 3	2	<i>Bacillus thuringiensis</i>	-	-	+	+	+	+	73,38	53,92
	15	<i>Bacillus megaterium</i>	-	+	-	+	+	+	67,85	58,52

<sup>1</sup> Produção de auxina

<sup>2</sup> Solubilização de fosfato inorgânico

<sup>3</sup> Solubilização de óxido de zinco

<sup>4</sup> Atividade celulolítica

<sup>5</sup> Atividade proteolítica

<sup>6</sup> Ação direta (método de estrias)

<sup>7</sup> Valores de porcentagem de controle do fungo

<sup>8</sup> Valores de porcentagem de promoção de crescimento em relação ao controle

Símbolo: (+) positivo e (-) negativo para a característica funcional

Os isolados bacterianos foram selecionados de acordo com a habilidade em reduzir a infecção das plantas da variedade Perinha para cada raça de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. As bactérias selecionadas como potenciais agentes de biocontrole para raça 1 promoveram controle de pelo menos 93,25% nas plantas. As bactérias selecionadas como agentes de biocontrole para raça 2 promoveram total controle ao fungo, garantindo 100% de proteção das plantas e as bactérias selecionadas como agentes de biocontrole para raça 3 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* promoveram controle de pelo menos 67,85% das plantas quando comparado ao tratamento sem inoculação do fungo. Resultados positivos para controle de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* foram relatados por Nascimento (2009) e Rocha e Moura (2013), variando de 22,5 a 76% de controle utilizando bactérias das espécies *B. cereus*, *B. polymyxa*, *B. lentus*, *Bacillus* sp. e *B. pumilus* como agentes de biocontrole. Prashar et al. (2013) também relataram que a bactéria *B. subtilis*, isolada da rizosfera de plantas saudáveis de tomateiro, apresentou metabolismo antagônico a *F. oxysporum* em testes *in vitro*. O uso de *B. cereus* como antagonista a *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* também foi avaliado por Ferraz et al. (2014) que relataram que isolado bacteriano reduziu em 47% os sintomas de murcha-de-fusário em caule de tomateiro em casa de vegetação, mostrando que bactérias desse gênero são potenciais agente de biocontrole.

Uma das hipóteses para o controle das raças de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* pelos isolados bacterianos pode ser devido a produção de protease pelas estirpes, visto que essa foi uma característica observada para a maioria dos isolados selecionados. Segundo Basurto-Cadena et al. (2011) a produção de proteases *in vitro* por uma estirpe de *B. subtilis* pode ser responsável pela atividade antagonística contra os fungos e bactérias patogênicas. A promoção de crescimento em tomateiro pelas estirpes selecionadas pode ter eventualmente ocorrido devido a produção de indols, solubilização de fosfato inorgânico e zinco, já que quatro das cinco bactérias selecionadas apresentaram algumas dessas características funcionais, sendo essas características importantes na promoção de crescimento de plantas conforme demonstrado por (BASURTO-CADENA et al., 2011; ALMONEAFY et al., 2014). O único isolado (33 - *B. stratosphericus*) que não apresentou essas características funcionais, promoveu menor crescimento das plantas quando comparado a promoção de crescimento proporcionado pelas outras estirpes selecionadas. Cabe ressaltar que o substrato utilizado nos experimentos em casa de vegetação não era deficiente em fósforo e zinco e portanto o efeito observado da contribuição das bactérias quanto a solubilização destes nutrientes evidentemente não seria significativa nessas condições. Estudos futuros devem ser realizados com o objetivo de identificar outras características funcionais envolvidas no controle de fungos tais como a atividade quitinolítica como demonstrado para o controle de *Phoma medicaginis* (SLIMENE et al., 2015) e produção de ácido cianídrico conforme demonstrado para o controle *in vitro* do fungo *Phytophthora infestans* (HUNZIKER et al., 2015). Estas características precisam ser estudadas a fim de identificar o fator ou os fatores que contribuem para o controle do fitopatógeno. Além disso, deve-se confirmar o caráter endofítico das estirpes estudadas. Para isso, as bactérias podem ser marcadas com gene *gfp* (PARENTE, 2007). E no caso das bactérias que apresentaram alta similaridade com a espécie *B. thuringiensis* é preciso confirmar se essas estirpes são portadoras de genes *cry* como estudo realizado Gitahy et al. (2007), que demonstraram a presença dos genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry2Aa1* e *cry2Ab2* na estirpe S76 da bactéria *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*.

Estudos em condições de campo com os isolados bacterianos selecionados para controle das raças 1, 2 e 3 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* para avaliar a viabilidade de uso dessas estirpes como potenciais agentes de controle biológico em áreas produtoras de tomate também precisam ser realizados. Sugere-se ensaios de proteção de plantas com misturas (duas até cinco

bactérias) de *Bacillus* selecionados acima a fim de desenvolver inoculante para ser utilizado por viveiristas na produção de mudas de tomateiro.

## 6 CONCLUSÕES

- Foi observado uma alta diversidade de espécies do gênero *Bacillus* no interior dos tecidos de plantas de tomate, sendo a espécie *B. megaterium* a mais frequente;
- As variedades de tomateiro Perinha e Carolina apresentaram suscetibilidade as raças 1, 2 e 3 do fungo, porém a variedade Perinha foi a que apresentou maior suscetibilidade. O híbrido Santa Clara Miss Brasil apresentou resistência a raça 1 e o híbrido Débora Plus apresentou resistência as raças 1, 2 e 3 do fungo no teste de seleção de genótipos suscetíveis;
- Testes *in vitro* mostraram uma redução no crescimento dos fungos por algumas estirpes bacterianas pelo método de ação direta (estrias paralelas);
- Tomateiros tratados com a espécie *B. stratosphericus* contribuiu para controle da doença de pelo menos 93,25% quando cultivados em substrato infestado com a raça 1 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*;
- Tomateiros tratados com estirpes pertencentes as espécies *B. megaterium* e *B. thuringiensis* em substrato infestado com raça 2 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* não desenvolveram sintoma de murcha aparente, garantindo 100% de controle. Essas espécies também contribuíram para controle da doença de pelo menos 67,85% em substrato infestado com a raça 3 do fungo;
- A estirpe da espécie *B. megaterium* (isolado 15) pois foi capaz de controlar a doença causada pela raça 2 e 3 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI, B.; SABRI, A.N.; LJUNG, K.; HASNAIN, S. (2009) Quantification of indole-3-acetic acid from plant associated *Bacillus* spp. and their phytostimulatory effect on *Vigna radiata* (L.). *World J Microbiol Biotechnol*, v. 25, p. 519–526.
- ALMONEAFY, A.A.; KAKAR, K.U.; NAWAZ, Z.; LI, B.; SAAND, M.A.; CHUN-IAN, Y.; XIE, G.L. (2014) Tomato plant growth promotion and antibacterial related-mechanisms of four rhizobacterial *Bacillus* strains against *Ralstonia solanacearum*. *Symbiosis*, v. 63, p. 59-70.
- ALVARENGA, M.A.R. (2004) Origem, Botânica e Descrição da Planta. In: Alvarenga MAR (Ed.) *Tomate: Produção em campo, em casa de vegetação e em hidroponia*. Lavras MG. UFLA. pp.15-23.
- ALSTCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHAFFER, A.A., ZHANG, J., (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 25, 3389 – 3402.
- ANGONESE, M. T.; DELLA-GIUSTINA, J.; PAIM, L. H.; PANSERA, M. R.; PAGNO, R. S.; MEZZOMO, F.; ZORZI, E.; PEREIRA, C. O. F.; RIBEIRO, R. T. S. (2009) Fungistatic effect of *Bacillus* spp on plant pathogenic fungi. *Revista Brasileira de Agroecologia*, v. 4, n. 2, p. 97-100.
- ARIAS, R.S.; SAGARDOY, M.A.; VAN VUURDE, J.W. (1999) Spatio-temporal distribution of naturally occurring *Bacillus* spp. and other bacteria on the phylloplane of soybean under field conditions. *J Basic Microbiol*. v. 39, p. 283–292.
- ASSAEEDI, A.; OSMAN, G.; ABULREESH, H. (2011) The occurrence and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* in the arid environments. *Australian Journal of Crop Science*. v. 5, p. 1185-1190.
- ASAKA, O.; SHODA, M. (1996) Biocontrol of *Rhizoctonia solani* Damping-off of Tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 4081-4085.
- BACON, C. W.; YATES, I. E.; HINTON D. M.; MEREDITH, F. (2001) Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. *Environmental Health Perspectives*, v. 109, p. 325-332.
- BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO, M. A.; OLIVARES, F. L.; VIANA, A. P.; BRESSAN-SMITH, R. (2010) Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar Vitória durante a aclimatização. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, v. 34, n. 2, p. 349-360.
- BARRETI, P. B.; de SOUZA, R. M.; POZZA, E. A. (2008) Bactérias endofíticas como agentes promotores do crescimento de plantas de tomateiro e de inibição *in vitro* de *Ralstonia solanacearum*. *Ciênc. Agrotec.*, v. 32, n. 3, p. 731-739.
- BARRETI, P.B.; ROMEIRO, R.S.; MIZUBUTI, E.S.G.; SOUZA, J.T. (2009) Seleção de bactérias endofíticas de tomateiro como potenciais agentes de biocontrole e de promoção de crescimento. *Ciênc. Agrotec.*, v. 33, p. 2038-2044.
- BASURTO-CADENA, M.G.L.; VÁZQUEZ-ARTISTA, M.; GARCIA-JIMÉNEZ, J.; SALCEDO-HERNÁNDEZ, R.; BIDESHI, D.K.; BARBOZA-CORONA, J.E. (2011) Isolation of a new Mexican strain of *Bacillus subtilis* with antifungal and antibacterial activities. *The Scientific World Journal*, v. 2012, 7 p.



- BECKMAN, C.H. (1987) The nature of wilts diseases of plants. St. Paul: APS Press, 175p.
- BEGUIN, P. & ANBERT, J.P. (1993) The biological degradation of cellulose. FEMS Microbiol Rev, v. 13, p. 25–58.
- BETTIOL, W.; GHINI, R.; MARIANO, R.R.L.; MICHEREFF, S.; MATTOS, L.P.V.; ALVARADO, I.C.M.; PINTO, Z.V. Supressividade a fitopatógenos habitantes do solo. In: Bettiol, W. & MORANDI, M.A.B. (Eds.) (2009) Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas, p. 187-208.
- BLANCARD, D. (1996) Enfermedades del tomate: observar, identificar, luchar. Montfavet: INRA, p. 212.
- CANHOS, V.P.; UMINO, C.Y.; MANFIO, G.P. (2004) Coleções de culturas de microrganismos. Resumo: Coleções de culturas de microrganismos. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP - Centro de Referência em Informação Ambiental - CRIA.
- CHEN, Y.; REKHA, P.; ARUN, A. (2006) Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. Appl Soil Ecol, v. 34, p. 33–41.
- CHERNIN, L.; ISMAILOV, Z.; HARAN, S.; CHET, I. (1995) Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* Antagonistic to Fungal Plant Pathogens. Applied and Environmental Microbiology. p. 1720-1726.
- CHO, K.M.; HONG, S.Y.; LEE, S.M.; KIM, Y.H.; KAHNG, G.G.; LIM, Y.P.; KIM, H.; YUN, H.D. (2007) Endophytic bacterial communities in ginseng and their antifungal activity against pathogens. V. 54, p. 341-351.
- CORDERO, P.; PRÍNCIPE, A.; JOFRÉ, E.; MORI, G.; FISHER, S. (2014) Inhibition of the phytopathogenic fungus *Fusarium proliferatum* by volatile compounds produced by *Pseudomonas*. Arch Microbiol. 196:803-809.
- CORRALES, L.C.; SÁNCHEZ, L.C.; CUERVO, J.; JOYA, J.A.; MARQUEZ, K. (2012) Efecto biocontrolador de *Bacillus* spp., frente a *Fusarium* sp., bajo condiciones de invernadero en plantas de tomillo (*Thymus vulgaris* L.). Nova. Publicación Científica en Ciencias Biomédicas, v. 10, n. 17.
- CORRELL, J.C. (1991) The relationship between formae speciales, races, and vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum*. Phytopathology, St. Paul, v.81, n.9, p.1061-1064.
- COSTA, H.; ZAMBOLIM, L.; VENTURA, J. A. (2007) Doenças de hortaliças que se constituem em desafio para o controle. In: ZAMBOLIM, L. et al. (Eds.). Manejo integrado de doenças e pragas: hortaliças. Viçosa: Editora UFV. p.319-336.
- CURL, E. A. (1963) Control of plant diseases by crop rotation. The Botanical Review, v. 29, p. 413- 479.
- DESLANDES, J.A. (1940) Doenças do tomateiro no Nordeste. Boletim da Sociedade Brasileira de Agronomia, Rio de Janeiro, v.3, n.4, p.442-453.
- DHILLON, N.; CHHIBBER, S. & SAXENA, M. (1985) A constitutive endoglucanase (CMCase) from *Bacillus licheniformis*-1. Biotechnology Letters, v. 7 (9), p. 695–697.

- DOBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. (1995) Como isolar e identificar bacterias diazotroficas de plantas nao-leguminosas. Brasilia : EMBRAPA-SPI, Itaguai : EMBRAPA-CNPAB, 60p.
- DONG, Z.; CANNY, M. J.; MCCULLY, M. E.; ROBOREDO, M. G.; CABADILLA, C. F.; ORTEGA, E.; RODÉS, R. (1994) A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems. *Plant Physiol.*, v. 105, p. 1139-1147.
- DWORKIN, M.; FOSTER, J. (1958). Experiments with some microorganisms which utilize ethane and hydrogen. *J. Bacteriol.* 75: 592-601.
- EMBRAPA Hortaliças. (2006) Cultivo de Tomate para Industrialização. Sistemas de Produção, 1 - 2ª Edição. Versão Eletrônica. Disponível em: [http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Tomate/TomateIndustrial\\_2ed/index.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Tomate/TomateIndustrial_2ed/index.htm) .Acesso em 26 de março de 2014.
- FAO. Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação. Disponível em:< <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/S>>. Acesso em março de 2014.
- FENG, H.; LI, Y.; LIU, Q. (2013) Endophytic bacterial communities in tomato plants with differential resistance to *Ralstonia solanacearum*. *Afr J Microbiol Res* 7:1311–1318.
- FERRAZ, H. G. M.; RESENDE, R. S.; SILVEIRA, P. R.; ANDRADE, C. C. L. A.; MILAGRES, E. A.; OLIVEIRA, J. R.; RODRIGUES, F. A. (2014) Rhizobacteria induces resistance against *Fusarium* wilt of tomato by increasing the activity of defense enzymes. *Bragantia*, Campinas. v. 73, n. 3, p. 274-283.
- FURUSHITA, M.; SHIBA, T.; MAEDA, T.; YAHATA, M.; KANEOKA, A.; TAKAHASHI, Y.; TRII, K.; HASEGAWA, T.; OHTA, M. (2003) Similarity of tetracycline resistance genes isolated from fish farm bacteria to those from clinical isolates. *Appl Environ Microbiol* 69: 5336–5342.
- GAUMANN, E. (1957) Fusaric acid as a wilt toxin. *Phytopathology*, St. Paul, v. 47, p.324- 357.
- GITAHY, P. M.; SOUZA, M. T de.; MONNERAT, R. G.; ARRIGONI, E. B.; BALDANI, J. I. A Brazilian *Bacillus thuringiensis* strain highly active to sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 38, n. 3, 2007.
- GLICK, B. R.; BASHAN, Y. (1997) Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. *Biotechnology*, v. 15, n. 12, p. 353-378.
- GORDON, S. A.; WEBER, R. P. (1951) Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiology*, Baltimore, v. 26, n. 1, p.192-195.
- GOULART, A.C.P. (2002) Benefícios do tratamento de sementes de algodoeiro com fungicidas no controle do tombamento em relação à densidade de inóculo de *Rhizoctonia solani*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, DF, v. 27, Supl., p. 218.
- GRAM, C. (1884) Ueber die isolirte Fibrung der Schizomyceten iu Schnitt-und Trockenpreparaten. *Fortschritte der Medicin*, Vol. 2, pages 185-189.
- HUNZIKER, L.; BONISCH, D.; GROENHAGEN, U.; BAILLY, A.; SCHULZ, S.; WEISSKOPF, L. (2015) *Pseudomonas* strains naturally associated with potato plants produce volatiles with high potential for inhibition of *Phytophthora infestans*. *Appl and Environ Microbiol*, v. 81, n. 3, p. 821-830.

IBGE. Levantamento Sistemático da produção Agrícola: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil/Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2015). Levant. Sistem. Prod. Agríc. Rio de Janeiro v. 29, n. 6, p. 1-81 junho de 2015. Disponível em: [ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Agricola/Levantamento\\_Sistematico\\_da\\_Producao\\_Agricola\\_\[mensal\]/Fasciculo/lspa\\_201506.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Fasciculo/lspa_201506.pdf)

JARAMILLO, J.; RODRÍGUEZ, V. P.; GUZMÁN, M.; ZAPATA, M.; RENGIFO, T. (2007) Manual Técnico: Buenas Prácticas Agrícolas en la producción de tomate bajo condiciones controladas.

JORQUERA, M.A.; HERNANDÉZ, M.T.; RENGEL, Z. (2008) Isolation of culturable phosphobacteria with both phytate-mineralization and phosphate solubilization activity from the rhizosphere of plants grown in a volcanic soil. *Biol Fertil Soils*, v. 44, p. 1025–1034.

JULIATTI, F. C. et al. (1994) Avaliação e identificação de genótipos de tomateiro como diferenciadores para as raças de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 19, n. 4, p. 546-551.

KASANA, R. C.; SALWAN, R.; DHAR, H.; DUTT, S.; GULATI, A. (2008) A Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine. *Curr Microbiol.* 57:503-507.

KEFI, A.; SLIMENE, I.B.; KARKOUCH, I.; RIHOUEY, C.; AZAEIZ, S.; BEJAOUI, M.; BELAID, R.; COSETTE, P.; JOUENNE, T.; LIMAM, F. (2015) Characterization of endophytic *Bacillus* strains from tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) displaying antifungal activity against *Botrytis cinerea* Pers, *World Journal of Microbiol and Biotech*, p.

KINET, J.M.; PEET, M.M. (1997) Tomato. En: *The Physiology of Vegetable Crops.*, New York: (Ed. H.C. Wien). CAB International. p. 207-258.

KUMAR, V.; NARULA, N. (1999) Solubilization of inorganic phosphates and growth emergent of wheat as affected by *Azotobacter chroococum* mutants. *Biol Fert Soils* 28:301– 305.

KUPPER, K. C.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOES, A. (2003) Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 28, n. 3, p. 251-257.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A. P. (2005) Doenças do tomateiro. In: KIMATI, H. et al. (Eds.). *Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas*. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 2, p. 607- 626.

LADEIRA, S.A.; CRUZ, E.; DELATORRE, A.B.; BARBOSA, J.B.; MARTINS, M.L.L. (2015) Cellulase production by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 and its detergent compatibility. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 18, p. 110-115.

LEELASUPHAKUL, W.; HEMMANEE, P.; CHUENCHITT, S. (2008) Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*. V.48, p.113-121.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. (2006) *The Fusarium laboratory manual*. Ames: Blackwell, 388 p.

- LIN, S.Y.; HAMEED, A.; LIU, Y.C.; WEN, C.Z.; LAI, W.A.; HSU, Y.H.; YOUNG, C.C. (2015) *Bacillus lycopersici* sp. nov., isolated from a tomato plant (*Solanum lycopersicum* L.). Int J Syst Evol Microbiol, v. 65, p. 2085-2090.
- LOGAN, N.A.; De VOS, P. (2009) Genus I. *Bacillus* Cohn 1872. In: (Eds.) P.D.Vos, G. Garrity, D.Jones, N.R.Krieg, W.Ludwig, F.A. Rainey, K.-H. Schleifer, W.B. Whitman. Bergey's Manual of systematic bacteriology, Volume 3: The Firmicutes, Springer, 21-127.
- LOPES, C.A.; REIS, A.; ÁVILA, C. (2003) Principais doenças do tomate para mesa causadas por fungos, bactérias e vírus. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 24, n. 219, p. 66-78.
- LOPES, C.A. & SANTOS, J.R.M. (1994) Doenças do tomateiro. Brasília: EMBRAPA-CNPQ/SPI, 67p.
- MACHADO, L.P.; MICHEREFF, S.J.; FALLEIRO, B.A.S.; OLIVEIRA, M.G.; COUTINHO, W.M.; MORELLO, C.L.; SUASSUNA, N.D. (2009) Um método simples e rápido de seleção para resistência à murcha-de-fusário em genótipos de algodoeiro. Tropical Plant Pathology, vol. 34 (1) p. 051-055.
- MACIEL, C.G.; WALKER, C.; MUNIZ, M.F.B.; ARAÚJO, M.M. (2014) Antagonismo de *Trichoderma* sp. e *Bacillus subtilis* (UFV3918) a *Fusarium sambucinum* em *Pinus elliottii* ENGELM. Revista Árvore, v. 38, n. 3, p. 505-512.
- MAGNANI, G.; DIDONET, C.; CRUZ, L. (2010) Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane. Genet Mol Res v. 9, p. 250-258.
- MAHESHKUMAR, K.S.; KRISHNARAJ, P.U.; ALAGWADI, A.R., (1999) Mineral solubilising activity of *Acetobacter diazotrophicus*, a bacterium associated with sugarcane. Curr Sci 76:874-875.
- MAKISHIMA, N.; MELO, W.F. (2004) O rei das hortaliças: o tomateiro é a mais importante das hortaliças e, no Brasil, a produtividade média é duas vezes maior que em outros países. Cultivar Hortaliças e Frutas 5:28-32.
- MARRA, L.M., SOARES, C.R.F.S.; de OLIVEIRA, S.M.; FERREIRA, P.A.A.; SOARES, B.L.; CARVALHO, R.F.; de LIMA, J.M.; MOREIRA, F.M.S. (2012) Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. Plant Soil, v. 357, p. 289-307.
- MARRONI, I.V.; GERMANI, J.C. (2011) Eficiência de rizobactérias *Bacillus* spp. no controle in vitro de *Macrophomina phaseolina* agente etiológico da podridão de tronco da mamona (*Ricinus communis* L). v. 6 (3), p. 159-167.
- MAROTO, J.V. (1994) Horticultura herbácea especial. Cuarta edición. Madrid: Mundi- Prensa.
- MICHEREFF, S.J.; ANDRADE, D.E.G.T.; PERUCH, L.A.M. (2005) Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares. Inóculo de patógenos radiculares. Inóculo de patógenos radiculares. cap 5 p. 93-124.
- NASCIMENTO, I.O. (2009) Isolamento, identificação e seleção de *Bacillus* spp. para o biocontrole de fitopatógenos do arroz. Dissertação (Mestrado em Agroecologia) Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 109p.
- NASCIMENTO, S.R.C.; KUROZAWA, C.; MARINGONI, A.C. (1995) Avaliação de raças fisiológicas de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*. Fitopatologia Brasileira, Brasília, v.20, n.2, p.214-217.

- NAUTIYAL, C.S. (2009) An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Letters*, v.170, n.1, p. 265-270.
- NELSON, P.E. (1981) Life cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum*. In: MACE, M. E.; BELL, A. A.; BECKMAN, C.H. (Eds.). *Fungal wilt diseases of plants*. New York: Academic Press, p. 51-80.
- OLIVAIN, C.; ALABOUVETTE, C. (1999) Process of tomato root colonization by a pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in comparison with a non-pathogenic strain. *New Phytol.* v. 141, 497–510.
- OZAKI, K. & ITO, S. (1991) Purification and properties of an acid endo-1,4- $\beta$ -glucanase from *Bacillus* sp. KSM-330. *Journal of General Microbiology*, v. 137 (1), p. 41–48.
- PAM - Produção Agrícola Municipal. (2012) Disponível em: [http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/66/pam\\_2012\\_v39\\_br.pdf](http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/66/pam_2012_v39_br.pdf)
- PANT, G.; PRAKASH, A.; PAVANI, J.V.P.; BERA, S.; DEVIRAM, G.V.N.S; KUMAR, A.; PANCHPURI, M.; PRASUNA, R.G. (2015) Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. *Journal of Taibah University for Science*, v. 9, p. 50-55.
- PARENTE, A.F.A. Expressão de gfp em *Bacillus thuringiensis* S76 uma estirpe selvagem ativa para Lepidoptera. 2007. 103 f., il. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) Universidade de Brasília, Brasília, 2007.
- PAZ, I.C.P.; SANTIN, R.C.M.; GRIMARÃES, A.M.; ROSA, O.P.P.; DIAS, A.C.F.; QUECINE, M.C.; AZEVEDO, J.L.; MATSUMURA, A.T.S. (2012) Eucalyptus growth promotion by endophytic *Bacillus* spp. *Genetics and Molecular Research*. v.11 (4), p. 3711-3720.
- PENROSE, D.M.; GLICK, B.R. (2003) Methods for isolating and characterizing ACC deaminase containing plant growth promoting rhizobacteria. *Physiologia Plantarum*, 118: 10-15.
- PESAGRO-RIO. (2012) Disponível em: <http://www.pesagro.rj.gov.br/downloads/riorural/36%20Tomate%20Orgânico.pdf>
- PETRAS, S. F.; CASIDA, L. E. J. (1985) Survival of *Bacillus thuringiensis* spores in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 50, p. 1496-1501.
- PLEBAN, S.; CHERNIN, L.; CHET, I. (1997) Chitinolytic activity of an endophytic strain of *Bacillus cereus*. *Letters of Applied Microbiology*, Oxford, v. 25, n. 4, p. 284-288.
- POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKERS, A. S. (1949) Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, London, v. 164, p. 666.
- PRASHAR, P.; KAPOOR, N.; SACHDEVA, S. (2013) Isolation and Characterization of *Bacillus* sp with *In-vitro* Antagonistic Activity against *Fusarium oxysporum* from Rhizosphere of Tomato. *J. Agr. Sci. Tech.* v.15: 1501-1512.
- RADDADI, N.; CHERIF, A.; BOUDABOUS, A.; DAFFONCHIO, D. (2008) Screening of plant growth promoting traits of *Bacillus thuringiensis*. *Annals of Microbiology*, 58 (1) p. 47-52.
- RAMESH, A.; SHARMA, S.K.; SHARMA, M.P. (2014) Inoculation of zinc solubilizing *Bacillus aryabhatai* strains for improved growth, mobilization and biofortification of zinc in soybean and wheat cultivated in Vertisols of central India. *Appl Soil Ecol*, v. 73, p. 87–96.

- RAUPACH, G. S.; KLOEPPER, J. W. (1998) Mixtures of plants growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. *Phytopathology*, St. Paul, v. 88, p. 1158-1164.
- REIS, A., COSTA, H., BOITEUX, L.S. & LOPES C.A. (2005) First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 on tomato in Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 30:426-428.
- REIS, A.; BOITEUX, L.S. (2007) Outbreak of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 in commercial fresh-market tomato fields in Rio de Janeiro State, Brazil. *Horticultura Brasileira* 25: 451-454.
- REIS, A.; LOPES, C.A. (2007) Principais fungos de solo em hortaliças: Epidemiologia e manejo. In: ZAMBOLIM, L.; LOPES, C.A.; PICANÇO, M.C.; COSTA, H. (eds). Manejo integrado de doenças e pragas: Hortaliças. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. p. 189-224.
- RHODES, M. E. (1957) The preservation of *Pseudomonas* under mineral oil. *Journal of Applied Microbiology*, Oxford, v. 20, n. 1, p.108–118.
- RICHAEL, C., GILCHRIST, D. (1999) The hypersensitive response: a case of hold or fold. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55:5-12.
- ROBSON, L.M. & CHAMBLISS, G.H. (1984) Characterization of the cellulolytic activity of a *Bacillus* isolate. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 47 (5), p. 1039–1046.
- ROCHA, F.Y.O. (2013) Caracterização de bactérias isoladas de plantas de cana-de-açúcar e seu efeito na promoção de crescimento de plantas de tomate cv. Santa Clara. 39 p. Monografia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica - RJ. 13/09/2013.
- ROCHA, D.J.A. & MOURA, A.B. (2013) Controle biológico da murcha do tomateiro causada por *Ralstonia solanacearum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* por rizobactérias. *Tropical Plant Pathology* 38 (5).
- RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR.V.A.; VICTOR, O. (1986) Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* tipo B. *Summa Phytopathologica*, Campinas, v. 12, n. 1-2, p. 16.
- RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, v. 17, p. 319-339.
- ROMEIRO, R. S. (2006) Preservação de culturas de bactérias fitopatogênicas. Material didático, Laboratório de Bacteriologia de Plantas, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- SANTARÉM, E.R. (2004) Metabólitos secundários e defesa vegetal. In: TAIZ, L. E ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. Artmed. p. 309-334.
- SANTOS, J.R.M. (1996) Methodology for screening tomato for *Fusarium* wilt, *Verticillium* wilt, gray leaf spot, early blight, and septoria leaf spot. In: International conference on the processing tomato, 1., 1996, Recife, PE. Proceedings... Recife: Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária – IPA/ American Society of Horticultural Sciences. p. 164–166.
- SARAN, S.; ISAR, J.; SAXENA, R.K. (2007) A modified method for the detection of microbial

proteases on agar plates using tannic acid. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. v. 70 p. 697–699.

SARANAVAN, V.S.; SUBRAMONIAM, S.R.; SAVARIAPPAN, A.R. (2003) Assessing *in vitro* solubilization potential of different zinc solubilizing bacterial (ZBS) isolates. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 34, p. 121-125.

SARANAVAN, V.S.; KALAIARASAN, P.; MADHAIYAN, M.; THANGARAJU, M. (2006) Solubilization of insoluble zinc compounds by *Gluconacetobacter diazotrophicus* and the detrimental action of zinc ion (Zn<sup>2+</sup>) and zinc chelates on root knot nematode *Meloidogyne incognita*. *The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology*, 235–241p.

SARWAR, M.; KREMER R. J. (1995) Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. *Letters in Applied Microbiology*, Oxford, v. 20, p. 282-285.

SCHISLER, D. A.; SLININGER, J. P.; BEHLE, W. R.; JACKSON, A. M. (2004) Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant diseases. *Phytopathology*, St. Paul, v. 94, p. 1267-1271.

SHARMA, S.K.; SHARMA, M.P.; RAMESH, A.; JOSHI, O.P. (2012) Characterization of zinc-solubilizing *Bacillus* isolates and their potential to influence zinc assimilation in soybean seeds. *J Microbiol Biotechnol*, v. 22, p. 352– 359.

SCHWYN, B., NEILANDS, J. B. (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* 160,p. 47–56.

SHIOMI, H.F. (2007) Bioprospecção de bactérias endofíticas como agentes de biocontrole da mancha de *Exserohilum turcicum* e como promotoras de crescimento de plantas de milho (*Zea mays*). Tese (Doutorado em Agronomia) Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu- SP, 57p.

SILVA, M.C.; VÁRZEA, V.; GUIMARÃES, L.G.; AZINHEIRA, H.G.; FERNANDEZ, D.; PETIOT, A.S.; BERTRAND, B.; LASHERMES, P.; NICOLE, M. (2006) Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. *Braz. J. Plant Physiol.*, 18(1):119-147.

SILVA, D. J. H.; FONTES, P. C. R.; MIZUBUTI, E. S. G.; PICANÇO, M. C. Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). In: PAULA JÚNIOR, T. J.; VENZON, M. 101 (2007) *Culturas: Manual de Tecnologias Agrícolas*. Belo Horizonte: Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), v. 1, p. 209-220.

SLIMENE, I. B.; TABBENE, O.; GHARBI, D.; MNASRI, B.; SCHMITTER, J. M.; URDACI, M.C.; LIMAM, F. (2015) Isolation of a chitinolytic *Bacillus licheniformis* S213 strain exerting a biological control against *Phoma medicaginis* infection. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 175, n. 7, p. 3494-3506.

SMITH, R.A.; COUCHE, G.A. (1991) The phylloplane as a source of *Bacillus thuringiensis* variants. *Appl Environ Microbiol*. v. 57, p. 311–315.

SOUZA, L.T.; MICHEREFF, S.J.; LARANJEIRA, D.; ANDRADE, D.E.G.T.; FERRAZ, E.; LIMA, G.S.A.; REIS, A. (2010) Reação de genótipos de tomateiro `as raças 2 e 3 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Horticultura Brasileira* 28: 102-106.

SOUZA, S.A.; XAVIER, A.A.; COSTA, M.R. (2013) Endophytic bacterial diversity in banana 'Prata Anã' (*Musa* spp.) roots. *Genet Mol Biol* v. 36, p. 252–264.

- TAMARI, K.; KAJI, J. (1954) Studies on the mechanism of the growth inhibitory action of fusaric acid on plants. *Journal of Bacteriology*, Washitgton, v. 41, p. 143-165.
- THAYER, D.W. DAVID, C.A. (1978) Growth of seeded cellulolytic enrichment cultures on mesquite wood. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 36 (2), p. 291–296.
- TINDALL, B. J.; ROSSELLÓ-MÓRA, R.; BUSSE, H. J., LUDWIG, W.; KAMPFER, P. (2010) Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *Int J Syst Evol Microbiol*, v. 60, p. 249–266.
- TOYODA, H.; HASHIMOTO, H.; UTSUMI, R.; KOBAYASHI, H. & OUCHI, S. (1988) Detoxification of fusaric acid by a fusaric acid-resistant mutant of *Pseudomonas solanacearum* and its application to biological control of *Fusarium* wilt of tomato. *Phytopathology*, St. Paul, v.78, n.11, p.1307–1311.
- VALE, F.X.R. et al. (2000) Doenças causadas por fungos em tomate. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R.; COSTA, H. (Eds.). *Controle de doenças de plantas: hortaliças*. Viçosa: Editora UFV. p.699-756.
- VALE, F. X. R. et al. (2004) Manejo integrado das doenças do tomateiro: epidemiologia e controle. In: ALVARENGA, M. A. R. (Ed.). *Tomate: produção em campo, em casa de vegetação e em hidroponia*. Lavras: Editora UFLA. p. 249-253.
- VAN PHAM, H.T.; KIM, J. (2014) *Bacillus thaonhiensis* sp. nov., a new species, was isolated from the forest soil of Kyonggi University by using a modified culture method. *Curr Microbiol*, v. 68 (1), p. 88-95.
- VARY, P.S.; BIEDENDIECK, R.; FUERCH, T. (2007) *Bacillus megaterium*—from simple soil bacterium to industrial protein production host. *Appl Microbiol Biotechnol*. v. 76, p. 957–967.
- VELÁZQUEZ, E.; ROJAS, M.; LORITE, M.J. (2008) Genetic diversity of endophytic bacteria which could be find in the apoplastic sap of the medullary parenchym of the stem of healthy sugarcane plants. *J Basic Microbiol* v. 48, p. 118–124.
- VERA-ESTRELLA, R.; BARKLA, B.J.; HIGGINS, V.J.; BLUMWALD, E. (1994) Plant defense response to fungal pathogens. Activation of host-plasma-membrane H<sup>+</sup>-ATPase by elicitor induced enzyme dephosphorylation. *Plant Physiol*. 104: 209–215.
- WANG H, QI M.; CUTLER, A.J. (1996) Phylogenetic analysis of *Fusobacterium prausnitzii* based upon the 16S rRNA gene sequence and PCR confirmation. *Int J Syst Bacteriol*, v. 46, p. 341–343.
- WANG, T.; LIU, M.Q.; LI, H.X. (2014) Inoculation of phosphate-solubilizing bacteria *Bacillus thuringiensis* B1 increases available phosphorus and growth of peanut in acidic soil. *Acta Agric Scand Sect B–Soil Plant Sci*, v. 64, p. 252–259.
- WHEELER, T. e RUSH, C.M. (2001) Soilborne diseases. In: Maloy, O.C. & Murray, T.D. (Eds.) *Encyclopedia of Plant Pathology*. New York. JohnWiley & Sons, p. 935-947.
- WHO (World Health Organization) (1999) International programme on chemical safety (IPCS): microbial pest control agent *Bacillus thuringiensis*. *Environ. Health Criteria*, v. 217, p. 1-105.
- WILHELM, E.; ARTHOFER, W.; SCHAFLEITNER, R.; KREBS, B. (1998) *Bacillus subtilis*, an endophyte of chestnut (*Castanea sativa*), as antagonist against chestnut blight (*Cryphonectria parasitica*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, v. 52, n. 1/2, p. 105-108.



WONG, L. C.; AMBRÓSIO, M. M. Q.; SOUZA, N. L. (2011) Sobrevivência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Raça 2 submetido a técnica da solarização associada à incorporação de folhas de mandioca. *Summa Phytopathologica*, v.37, n.2, p.129-133.

WULFF, E. G.; MGUNI, C. M.; MORTENSEN, C. N.; KESWANI, C. L.; HOCKENHULL, J. (2002) Biological control of black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) of brassicas with an antagonistic strain of *Bacillus subtilis* in Zimbabwe. *European Journal of Plant Pathology*, Dordrecht, v. 108, n. 4, p. 317-325.

ZACHOW, C.; GROSCHE, R.; BERG, G. (2011) Impact of biotic and a-biotic parameters on structure and function of microbial communities living on sclerotia of the soil-borne pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*.

ZHAO, L.; XU, Y.; SUN, R.; DENG, Z.; YANG, W.; WEI, G. (2011) Identification and characterization of the endophytic plant growth promoter *Bacillus cereus* strain MQ23 isolated from *Sophora alopecuroides* root nodules. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 42 p. 567-575.

## **ANEXOS**

### **ANEXO I - Preservação de bactérias isoladas de tomateiro**

#### **a) Preservação em glicerol 10%**

O uso do glicerol consiste em preservar e reduzir efeitos decorrentes do congelamento (POLGE et al., 1949). Para a preservação das bactérias isoladas um dos métodos utilizados foi o método de preservação em glicerol 10% estéril, utilizado na coleção de culturas da Embrapa Agrobiologia. Este método de preservação consiste em crescer as bactérias em placas de Petri contendo meio LB sólido (Luria Bertani Broth - 1g de triptona, 0,5g de extrato de levedura, 1g de NaCl e 15g.L-1 de ágar adicionados a 1000mL de água destilada, pH 7,0) (SAMBROOK et al., 1989) por período de 16 horas a 30°C. Após o crescimento foram colocados cerca de 3mL de uma solução de glicerol 10% estéril sobre a placa de Petri com a cultura crescida. Foi feita uma homogeneização e 1mL da solução homogeneizada foi transferido para tubos de criopreservação e 1mL transferidos para tubos com capacidade de 1,5mL, estes foram armazenados a -70°C e a -20°C, respectivamente.

#### **b) Preservação em óleo mineral**

A preservação em óleo mineral consiste em reduzir a quantidade de oxigênio disponível no meio, reduzindo o metabolismo do microorganismo (RHODES, 1957; ROMEIRO, 2006). Segundo Canhos et al. (2004), este método de preservação garante maior longevidade das bactérias, além de reduzir a velocidade de desidratação do meio de cultura devido a diminuição de oxigênio. O método de preservação utilizado é o mesmo utilizado na coleção de cultura da Embrapa Agrobiologia. Para a estocagem em óleo mineral as bactérias foram crescidas em frascos estéreis com capacidade de 10mL contendo metade do volume de meio LB sólido (Luria Bertani Broth - 1g de triptona, 0,5g de extrato de levedura, 1g de NaCl e 15g.L-1 de ágar adicionados a 1000mL de água destilada, pH 7,0) (SAMBROOK et al., 1989) por período de 48 horas a 30°C. Após o crescimento foram colocados cerca de 2mL de óleo mineral estéril sobre a cultura crescida, o frasco foi vedado com tampa de borracha estéril e armazenados a temperatura ambiente.

## ANEXO II - Curva de calibração de auxina ( $\mu\text{M.mL}^{-1}$ )

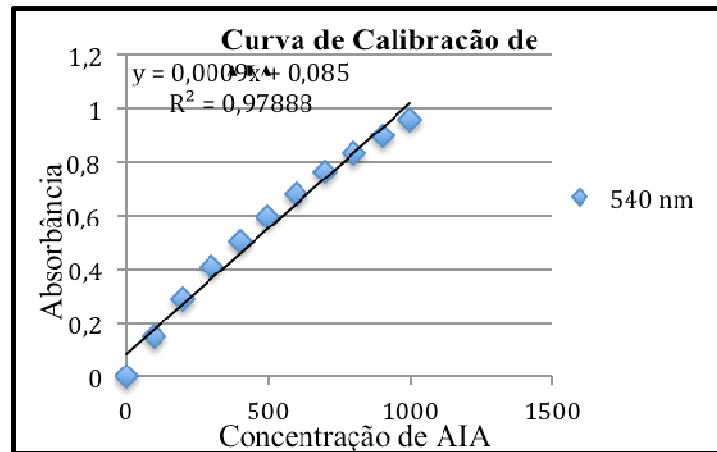


Figura 1. Curva de calibração de auxina ( $\mu\text{M.mL}^{-1}$ ) com valores de absorbância em função da concentração de auxina. Cada ponto representa a média de três repetições.

### ANEXO III - Avaliação das características funcionais das estirpes bacterianas

Tabela 1. Avaliação das características funcionais das estirpes bacterianas

Avaliação das características funcionais					
Isolado	Protease (mm)	Celulase (mm)	Fosfato (I.S.)	Zinco (I.S.)	Indols (D.O.)
Sp245 <sup>a</sup>	13,63	12,16	0,000	0,000	0,056
PAL 5	21,55	0,00	2,606	3,447	na
S76	18,89	47,37	1,681	1,624	0,054
2	15,23	46,28	0,000	2,135	0,018
8	13,39	44,73	1,306	0,000	0,056
10	0,00	30,53	1,117	0,000	0,046
11	0,00	46,09	1,258	1,917	0,038
12	15,30	32,90	0,000	0,000	0,013
15	15,08	32,07	1,088	0,000	0,043
16	0,00	32,74	0,000	0,000	0,012
17	25,32	31,06	1,000	0,000	0,007
18	0,00	31,18	0,000	0,000	0,102
20	0,00	64,22	1,406	2,168	0,023
21	14,95	32,74	1,128	0,000	0,022
22	18,43	48,74	0,000	0,000	0,086
24	16,52	45,96	1,535	0,000	0,021
25	25,59	32,14	1,527	0,000	0,014
26	16,93	32,84	0,000	0,000	0,059
27	15,28	0,00	1,414	0,000	0,052
28	0,00	43,86	1,387	2,367	0,058
29	16,23	32,99	1,167	0,000	0,060
32	14,75	40,63	1,325	0,000	0,060
33	18,90	0,00	0,000	0,000	0,054
40	25,46	44,21	0,000	0,000	0,054
48	21,01	28,20	0,000	0,000	0,054
51	25,85	48,22	0,000	1,484	0,033
73	13,27	48,35	0,000	0,000	0,051
87	11,97	77,66	1,157	0,000	0,035
102	13,39	44,49	0,000	0,000	0,043
113.1	23,07	73,07	1,061	0,000	0,041
119	12,94	43,16	0,000	0,000	0,042
137	16,56	42,04	1,259	1,771	0,033
146	26,58	37,97	0,000	0,000	0,043
154	27,80	45,72	1,317	1,583	0,112
178	25,91	47,20	1,278	0,000	0,102
3 C	0,00	0,00	*	*	*
8 C	15,16	4,21	*	*	*
12 C	0,00	0,00	*	*	*

20 C	0,00	0,00	*	*	*
21 C	0,00	32,00	*	*	*
22 C	0,00	0,00	*	*	*
23 C	0,00	0,00	*	*	*
27 C	12,68	35,11	*	*	*
28 C	15,49	31,11	*	*	*
32 C	12,99	30,73	*	*	*
33 C	0,00	11,73	*	*	*
36 C	0,00	0,00	*	*	*
38 C	25,14	0,00	*	*	*
42 C	19,85	43,38	*	*	*
48 C	14,84	0,00	*	*	*

\* Estirpes bacterianas caracterizadas por Melo et al., submetido.

<sup>a</sup> - Estirpe Sp245 de *Azospirillum brasilense*

I.S. - índice de solubilização (tamanho do halo formado/tamanho da colônia) (KUMAR & NARULA, 1999)

na - não avaliada