

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

DISSERTAÇÃO

Seleção de Estirpes de *Bacillus* spp. Eficientes no Controle da Murcha de Fusarium do Tomateiro e Mecanismos Envolvidos

Débora Cristina Lucas dos Santos

2022



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

**SELEÇÃO DE ESTIRPES DE *Bacillus* spp. EFICIENTES NO
CONTROLE DA MURCHA DE FUSARIUM DO TOMATEIRO E
MECANISMOS ENVOLVIDOS**

DÉBORA CRISTINA LUCAS DOS SANTOS

Sob a Orientação da Professora
Dr^a Margarida Gorete Ferreira do Carmo

e Co-orientação do Professor
Dr. José Ivo Baldani

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Fitotecnia**, no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da UFRRJ, Área de concentração em Produção Vegetal.

Seropédica, RJ
Março de 2022

FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S237s Santos, Débora Cristina Lucas dos, 10/07/1992-
Seleção de estirpes de *Bacillus* spp. eficientes no
controle da murcha de fusarium do tomateiro e mecanismos
envolvidos / Débora Cristina Lucas dos
Santos. - Seropédica, 2022.
64 f.: il.

Orientadora: Margarida Górete Ferreira do Carmo.
Coorientador: José Ivo Baldani.
Dissertação (Mestrado). - Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Programa de pós-graduação em Fitotecnia,
2022.

1. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. 2. Controle
biológico. 3. *Solanum lycopersicum*. 4. Endofíticos. I.
Ferreira do Carmo, Margarida Górete, 1963-, orient. II.
Baldani, José Ivo, -, coorient.
III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa
de pós-graduação em Fitotecnia. IV. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta Dissertação, desde que seja citada a fonte.

**O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de
Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.**



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA



**HOMOLOGAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº 61 / 2022 - DeptFITO
(12.28.01.00.00.00.32)**

Nº do Protocolo: 23083.066535/2022-90

Seropédica-RJ, 26 de outubro de 2022.

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

DÉBORA CRISTINA LUCAS DOS SANTOS

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Fitotecnia**, no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da UFRRJ, Área de Concentração em Produção Vegetal.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 31/03/2022

Dra. Margarida Górete Ferreira do Carmo (UFRRJ/IA/DeFITO)
(Orientadora/Presidente)

Dra. Marcia Reed Rodrigues Coelho (Embrapa Agrobiologia)
(Membro Externo)

Dr. Carlos Antônio dos Santos (UFRRJ/IA/DeFITO)
(Membro Interno)

(Assinado digitalmente em 27/10/2022 22:04)
MARGARIDA GORETE FERREIRA DO CARMO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptFITO (12.28.01.00.00.00.32)
Matrícula: 1213072

(Assinado digitalmente em 28/10/2022 08:45)
MARCA REED RODRIGUES COELHO
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 078.863.237-00

(Assinado digitalmente em 27/10/2022 06:20)
CARLOS ANTONIO DOS SANTOS
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 036.909.261-90

Para verificar a autenticidade deste documento entre em
<https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: 61, ano:
2022, tipo: HOMOLOGAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO, data de emissão:
26/10/2022 e o código de verificação: 09d108eae3

DEDICATÓRIA

Dedico

A todos aqueles que puderam despertar em mim a alegria algum dia

AGRADECIMENTOS

À minha família, por todo amor, carinho e apoio. Busco o melhor por nós.

Aos meus amigos de Viçosa-MG, em especial à Jael, Gabriel, Camila, Drylles, Lili, Pedro, pela parceria e por me incentivarem a embarcar nesta grande jornada.

Aos meus amigos de Seropédica, em especial a família Rocha que me acolheu com muito amor, Nath e Su, minhas primeiras amigas em Serô, e à turminha do alojamento da pós, grandes companheiras de vida.

À minha orientadora Dra. Margarida Gorete Ferreira do Carmo, por toda docura, paciência, inteligência e amor à prática de ensino.

Ao meu co-orientador Dr. José Ivo Baldani, pelas valiosas lições cotidianas de responsabilidade, dedicação e pelo incentivo e apoio durante toda minha pesquisa. Se tornou um dos meus maiores apoiadores na pós-graduação e terá minha admiração para toda a vida.

À Dra. Márcia Vidal pelo comprometimento e colaboração neste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório, do LabEPS – UFRRJ e do LGB – Embrapa Agrobiologia, e à minha turma do mestrado pelas trocas de conhecimento enriquecedoras. Agradeço a todos pelas conversas e sorrisos que me motivaram a cada dia. Em especial a Sebastian, Luciana, Mari, Juan, Carlos, Ju, José, Joana, Bruno e Guilherme por me ajudarem em alguns procedimentos. Mas acima de tudo, eu sempre estava sozinha no laboratório na pandemia, e em meio a dificuldades enfrentadas, me senti amparada, o que foi fundamental para não desistir.

A todos que proveram suporte em minhas pesquisas, como os funcionários da fitotecnia (agronomos e encarregados), assim como aos funcionários da Embrapa. Exalto a colaboração fundamental das analistas Carol e Patrícia.

Também gostaria agradecer o apoio de Antônio, Paulinho, Cristina, Pedro, Reginaldo, Roberto, Ernani, Claudinho, Marildo, Lili, Elaine, Raquel, Jacira, Delson, Felipe, Alan, Lenilson, que possibilitaram a concretização deste trabalho para além das bancadas.

Aos professores do PPGF por todo conhecimento transmitido.

Aos membros da banca pela disponibilidade e pelo enriquecimento adicionados à minha pesquisa e conhecimento de vida.

À Sebastian por todo o companheirismo, seu apoio foi fundamental para a conclusão deste projeto e à minha amiga Ivani, que pela sua sensibilidade e amor ao próximo, me trouxe aqui.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) na qual me senti extremamente acolhida e pela qual agora sinto grande amor, agradeço pelo suporte na execução desta pesquisa, em especial ao PPGF.

À Embrapa Agrobiologia pela infra-estrutura, suporte técnico e científico. Onde pude ter a mais enriquecedora experiência acadêmica minha vida.

À CAPES pelo apoio financeiro essencial para a realização deste trabalho.

À FAPERJ pelo apoio financeiro para execução do projeto.

E a todos os outros que de alguma forma contribuíram com a realização deste trabalho, incluindo a sociedade brasileira.

BIOGRAFIA

Débora Cristina Lucas dos Santos, filha de Vanda do Carmo Lucas dos Santos e Arlindo Eustáquio dos Santos, nasceu em 10 de julho de 1992 na cidade de Viçosa- MG. Fez o ensino médio na Escola Estadual Alice Loureiro. Em 2014 ingressou no curso de graduação em Agronomia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), onde atuou em ensino, pesquisa e extensão, sobretudo na área de educação em solos. Ingressou no mestrado, no curso de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), em 2019, onde desenvolveu atividades com o objetivo de selecionar estirpes endofíticas de *Bacillus* spp. com potencial antagonista à murcha de fusarium de tomateiro.

RESUMO

SANTOS, Débora Cristina Lucas dos. **Seleção de estirpes de *Bacillus* spp. eficientes no controle da murcha de fusarium do tomateiro e mecanismos envolvidos.** 2022. 64p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das hortaliças mais produzidas e consumidas no Brasil e no mundo e com grande importância social e econômica. É suscetível a várias doenças que podem acarretar grandes perdas em produtividade e qualidade dos frutos. Dentre estas, está a murcha de fusarium, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Scc.) Snyder e Hansen (*Fol*) que é uma das doenças mais limitantes à produção de tomateiro. Este estudo teve como objetivos: a) caracterizar, funcionalmente, estirpes de *Bacillus* spp. isoladas de tecidos de plantas de tomateiro, mantidas na coleção do Laboratório de Genética e Bioquímica da Embrapa Agrobiologia, com potencial de controle antagônico contra *Fol* e identificar os possíveis mecanismos envolvidos no antagonismo; b) determinar, em testes *in vitro*, estirpes bacterianas com atividade antagônica significativa a *Fol*; c) avaliar o potencial das estirpes em promover o controle da murcha de fusário do tomateiro industrial em condições de casa-de-vegetação; e e) avaliar os efeitos benéficos de *Bacillus* spp. em plantas de duas cultivares de tomate industrial. Realizaram-se testes de antagonismo, *in vitro*, e selecionaram-se oito estirpes, que promoveram redução de pelo menos 50% o crescimento micelial de *Fol*: DEST 30, DEST 31, DEST 38, DEST 60, DEST 78, DEST 83, DEST 132 e DEST 138. Estas foram submetidas a testes para caracterização funcional e quanto à capacidade de produzir proteases, celulases, pectinases, sideróforos, HCN e quitinases. A partir dos resultados, selecionaram-se quatro estirpes, DEST 31, DEST 60, DEST 83 e DEST 132, que foram avaliadas em casa de vegetação visando o controle da murcha de fusarium em duas cultivares de tomate industrial, Heinz 9553 e Clause HM 7885, inoculadas com dois isolados de *Fol* FUS 2903 e FUS 04-1. Todas as oito estirpes pré-selecionadas demonstraram atividade proteolítica e produção de sideróforos; a maioria apresentou atividade celulolítica e pectinolítica, com exceção de DEST 30; nenhuma das estirpes produziu HCN ou quitinase nos métodos empregados. De forma geral, as estirpes testadas não foram eficientes em controlar a murcha de fusarium do tomateiro. No entanto, plantas de Heinz 9553 tratadas com estirpe DEST 132 ou com as estirpes DEST 02, DEST 31 e DEST 132 apresentaram respostas positivas e significativas quanto ao crescimento quando inoculadas com FUS 2903 e FUS 04.1, respectivamente. Observou-se também maior acúmulo de massa fresca em plantas de Clause HM 7885 inoculadas com DEST 60, DEST 83 e DEST 132. Plantas tratadas com DEST 132 e inoculadas com FUS 04.1 tiveram acréscimo no crescimento e no aporte de massa fresca. Apesar de, em geral, não ter sido observado efeitos significativos das estirpes de *Bacillus* spp. testadas sobre o controle da doença, houve efeitos discretos quanto ao acúmulo de massa e melhoria no crescimento de plantas inoculadas com o patógeno.

Palavras-chave: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*; controle biológico; *Solanum lycopersicum*; bactérias endofíticas.

ABSTRACT

SANTOS, Débora Cristina Lucas dos. **Selection of *Bacillus* spp. strains efficient in the control of tomato fusarium wilt and mechanisms involved.** 2022. 64p. Dissertation (Master Degree in Plant Science). Instituto de Agronomia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is one of the most produced and consumed vegetables in Brazil and worldwide, with significant social and economic importance. It is susceptible to various diseases that can cause significant losses in productivity and fruit quality. Among these, Fusarium wilt, caused by the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Scc.) Snyder and Hansen (*Fol*), is one of the most limiting diseases for tomato production. This study aimed to: a) functionally characterize strains of *Bacillus* spp. isolated from tomato plant tissues, maintained in the collection of the Laboratory of Genetics and Biochemistry at Embrapa Agrobiology, with potential for antagonistic control against *Fol* and identify the possible mechanisms involved in antagonism; b) determine, in vitro tests, bacterial strains with significant antagonistic activity against *Fol*; c) evaluate the potential of the strains to promote control of Fusarium wilt in industrial tomato plants under greenhouse conditions; and d) assess the beneficial effects of *Bacillus* spp. on plants of two industrial tomato cultivars. Antagonism tests were conducted in vitro, and eight strains were selected, which promoted at least a 50% reduction in the mycelial growth of *Fol*: DEST 30, DEST 31, DEST 38, DEST 60, DEST 78, DEST 83, DEST 132, and DEST 138. These strains were subjected to tests for functional characterization and their ability to produce proteases, cellulases, pectinases, siderophores, HCN, and chitinases. Based on the results, four strains were selected, DEST 31, DEST 60, DEST 83, and DEST 132, which were evaluated in a greenhouse to control Fusarium wilt in two industrial tomato cultivars, Heinz 9553 and Clause HM 7885, inoculated with two isolates of *Fol* FUS 2903 and FUS 04-1. All eight pre-selected strains demonstrated proteolytic activity and siderophore production; most showed cellulolytic and pectinolytic activity, except for DEST 30; none of the strains produced HCN or chitinase in the methods employed. Overall, the tested strains were not efficient in controlling Fusarium wilt of tomato plants. However, Heinz 9553 plants treated with DEST 132 or with strains DEST 02, DEST 31, and DEST 132 showed positive and significant growth responses when inoculated with FUS 2903 and FUS 04.1, respectively. There was also a greater accumulation of fresh mass in Clause HM 7885 plants inoculated with DEST 60, DEST 83, and DEST 132. Plants treated with DEST 132 and inoculated with FUS 04.1 had increased growth and fresh mass input. Although, in general, significant effects of the tested *Bacillus* spp. strains on disease control were not observed, there were discreet effects regarding mass accumulation and growth improvement of plants inoculated with the pathogen.

Keywords: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*; Biological control; *Solanum lycopersicum*, endophytic bacteria.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mudas sadias, não inoculada com patógeno (à esquerda), e mudas infectadas, inoculada com o isolado FUS 08.2 de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (à direita), em teste utilizando a cultivar Heinz 9553	21
Figura 2. Inibição de isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> por estirpes de <i>Bacillus</i> spp. A linha vermelha pontilhada indica pelo menos 50% de inibição, valor mínimo adotado na seleção dos organismos antagonistas, destacados em azul.....	24
Figura 3. Crescimento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> , isolado FUS 1405, na presença das estirpes bacterianas DEST 60 (a), DEST 132 (b) e testemunha sem bactéria (c), em meio BDA.....	24
Figura 4. Crescimento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> , isolado FUS 3302, na presença das estirpes bacterianas DEST 60 (a), DEST 132 (b) e testemunha sem bactéria (c), em meio LB	25
Figura 5. Atividade celulolítica dos isolados DEST 60 (a), DEST 132 (b), DEST 30 (c) e o controle positivo FORT154 (d) em meio CMC com detecção pelo método de iodine	29
Figura 6. Hidrólise da proteína do leite presente no meio por meio de enzimas proteolíticas produzidas pelas estirpes DEST 60 (a), DEST 132 (b), DEST 30 (c) e o controle positivo FORT 154 (d).....	30
Figura 7. Produção de enzima pectinase por bactérias DEST 60 (a), DEST 78 (b), DEST 138 (c) e o controle positivo <i>Bacillus subtilis</i> CR25 (d).	30
Figura 8. Detecção de produção de HCN por bactérias. A produção de HCN modifica a cor do papel filtro de amarelo para marrom-alaranjada. A esquerda o controle positivo <i>Pseudomonas protegens</i> PS4 (a), enquanto na direita, a estirpe DEST 60 (b) com resultado negativo	31
Figura 9. Produção de quitinase por bactérias. A presença do corante Calcofluor White M2R torna o meio fluorescente na presença de luz ultravioleta facilitando a visualização do halo e das colônias. Controle positivo: <i>Paenibacillus illinoiensis</i> CB35 (j).....	31
Figura 10. Produção de sideróforos pelas oito estirpes bacterianas testadas pelo método de microplaca (ARORA & VERMA, 2017). Controle: LMC 44a, a partir das identificações se encontram as triplicatas.	32
Figura 11. Produção de sideróforos pelas estirpes DEST 138 (a), DEST 30 (b) e DEST 60 (c) pelo método de O-CAS de Schwyn e Neilands (1987) adaptado por Pérez-Miranda et al. (2007).	33
Figura 12. Estirpe bacteriana DEST 30 submetida ao teste de Gram.....	35
Figura 13. Bactéria DEST 132 submetida à pasteurização e crescimento após diluição seriada (10^{-4}) e plaqueamento.	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Origem de isolados de <i>Bacillus</i> spp. obtidos de plantas de tomateiro coletadas em lavouras no município de Nova Friburgo, RJ.....	12
Tabela 2. Relação de isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> com respectivos códigos de identificação, local de coleta e data das coletas.	12
Tabela 3. Porcentagem de infecção vascular (PIV%), incidência de plantas infectadas (I), severidade expressa em nota conforme escala de Santos (1997) de duas cultivares de tomateiro (Clause HM 7885 e Heinz 9553), inoculadas com 11 isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp <i>lycopersici</i>	22
Tabela 4. Altura das plantas (cm) de duas cultivares de tomateiro inoculadas com 11 isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	22
Tabela 5. Correlação entre massa fresca da parte aérea (MFPA) e porcentagem de infecção vascular (PIV%).	23
Tabela 6. Resultado de teste em estrias paralelas, em meio BDA e LB, medido com base no crescimento micelial de quatro isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (mm^2) (FUS 2903, FUS 3302, FUS 1405, FUS 04.1), expresso pela área das colônias, e sua inibição relativa em relação à testemunha (%IR) por oito estirpes bacterianas previamente selecionadas.	26
Tabela 7. Atividade celulolítica, proteolítica e pectinolítica de estirpes bacterianas medidas como base em índice enzimáticos (IE), determinado pela relação entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia.....	28
Tabela 8. Produção de sideróforos pelas estirpes bacterianas pelo método O-CAS (PÉREZ-MIRANDA et al., 2007)	32
Tabela 9. Resultado sumarizado das características funcionais de estirpes de <i>Bacillus</i> previamente identificadas como promissoras no antagonismo de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> , onde + (atividade positiva); - (atividade inexistente), de acordo com os métodos utilizados.....	34
Tabela 10. Altura do caule, massa fresca da parte aérea e severidade da murcha de fusarium, expressa por Nota, e porcentagem de infecção vascular (PIV%), avaliados em plantas da cultivar Heinz 9553 inoculadas com dois isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> , FUS 2903 e FUS 04.1, e com estirpes de bactérias e tratamento testemunha.....	36
Tabela 11. Altura da haste, massa fresca da parte aérea e severidade da murcha de fusarium, causada por <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> , expressa por Nota e porcentagem de infecção vascular (PIV%), avaliados em plantas da cultivar Clause HM7885 inoculadas com dois isolados do patógeno, FUS 2903 e FUS 04.1, e com seis estirpes da bacteria em teste e tratamento testemunha	37

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1	Tomateiro.....	2
2.2	Murcha-de-fusário do tomateiro	2
2.3	Epidemiologia e controle da murcha-de-fusário do tomateiro	4
2.3.1.	Controle cultural	4
2.3.2.	Controle físico	5
2.3.3.	Controle químico	5
2.3.4.	Controle genético.....	6
2.3.5.	Controle biológico	7
2.3.6.	<i>Bacillus</i> spp. e controle biológico de doenças de plantas.....	7
3	MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1	Obtenção dos microrganismos.....	11
3.1.1.	Obtenção dos isolados de <i>Bacillus</i> sp.....	11
3.1.2.	Isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	12
3.2	Caracterização dos isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> quanto à patogenicidade	13
3.3	Seleção de isolados de <i>Bacillus</i> com atividade antagônica a <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	14
3.3.1.	Pré-seleção das estirpes bacterianas com atividade antagônica pelo método de estrias paralelas.....	14
3.3.2.	Teste de antagonismo <i>in vitro</i> pelo método de estrias paralelas.....	15
3.4	Caracterização funcional de estirpes de <i>Bacillus</i> com ação antagonista a <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> <i>in vitro</i>	15
3.4.1.	Atividade celulolítica.....	15
3.4.2	Atividade proteolítica	16
3.4.3	Atividade pectinolítica.....	16
3.4.4	Produção de ácido cianídrico (HCN).....	17
3.4.5	Atividade quitinolítica	17
3.4.6	Produção de sideróforos	17
3.5	Caracterização das estirpes de <i>Bacillus</i>	18
3.5.1.	Teste de Gram para diferenciação dos grupos bacterianos.....	18
3.5.2.	Pasteurização	19
3.6	Teste de controle da murcha de fusarium do tomateiro em mudas, sob condições de casa-de-vegetação	19
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
4.1	Caracterização inicial de isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	21
4.2	Seleção de estirpes de <i>Bacillus</i> eficientes na inibição de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> em ensaios <i>in vitro</i>	23
4.3	Inibição <i>in vitro</i> em testes usando o método de estrias paralelas	24
4.4	Caracterização funcional das estirpes de <i>Bacillus</i> spp.....	28
4.4.1	Atividade celulolítica.....	28
4.4.2.	Atividade proteolítica	29
4.4.3.	Produção de pectinase	30
4.4.4.	Produção de ácido cianídrico.....	30

4.4.5. Atividade quitinolítica	31
4.4.6. Produção de sideróforos	32
4.5 Caracterização das estirpes selecionadas de <i>Bacillus</i> spp	34
4.5.1 Teste de Gram e pasteurização	34
4.6 Testes em casa de vegetação com as cultivares Heinz 9553 e Clause HM 7885	35
5 CONCLUSÕES.....	40
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

1 INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é a segunda hortaliça mais produzida e consumida no mundo e a mais importante sob o ponto de vista socioeconômico. É uma cultura suscetível a muitas doenças que podem incidir na parte aérea, no sistema vascular e nas raízes (KUROZAWA & PAVAN, 2005) e levar a consideráveis perdas de produção e qualidade dos frutos.

A murcha de fusarium, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Scc.) Snyder e Hansen (*Fol*), está entre as doenças mais limitantes à produção de tomateiro (NIRMALADEV et al., 2016). O agente, *Fol*, é um patógeno hemibiotrófico, com especificidade hospedeira a nível de espécie e de variedade, e grande capacidade de sobrevivência no solo. Infecta, coloniza e obstrui os vasos do xilema devido ao desenvolvimento das hifas e produção de toxinas e reação da planta à infecção que resultam em formação de géis e tiloses (SRINIVAS et al., 2019). Este quadro resulta em sintomas típicos como amarelecimento de folhas e murchas e, em casos mais severos, morte das plantas.

Uma vez o patógeno introduzido e disperso nas áreas de cultivo, o controle é predominantemente feito com a utilização de cultivares resistentes (REIS et al., 2004a), medida mais usada no Brasil e no mundo, tanto em lavouras de tomate para consumo *in natura* como para processamento industrial. Como o patógeno apresenta especialização fisiológica a nível de raça, é necessário o conhecimento prévio das raças predominantes localmente para escolha da(s) cultivar(es) a ser(em) plantada(s), o que muitas vezes restringe as opções. Ademais, em alguns casos tem-se apenas resistência parcial, o que leva à necessidade de adoção de medidas complementares visando a redução das perdas causadas pela doença (MCGOVERN, 2015).

O controle biológico da murcha de fusarium, assim como o de várias outras doenças causadas por patógenos habitantes do solo, utilizando-se microrganismos antagonistas, é uma das estratégias mais promissoras (MCGOVERN, 2015). Entre os organismos mais utilizados para o biocontrole de doenças estão espécies de *Bacillus*, pela versatilidade e capacidade de colonização de diferentes meios, de esporulação e de supressão de doenças (ROMERO et al., 2007) por meio de mecanismos diversos, incluindo a produção de compostos bioativos (ONGENA & JACQUES, 2008).

Dentro deste contexto, desde 2015 vem sendo realizadas pesquisas visando o controle biológico da murcha de fusarium do tomateiro. O trabalho iniciou com o isolamento e testes com diferentes estirpes de *Bacillus* spp., obtidas a partir de plantas tomateiro sadias mesmo estandoem áreas contaminadas pelo fitopatógeno, coletadas no município de Nova Friburgo, RJ. Estes isolados hoje compõem uma coleção de culturas que é mantida no laboratório de Genética e Bioquímica da Embrapa-Agrobiologia (ROCHA, 2015).

Com base na hipótese de que nesta coleção existem isolados de *Bacillus* spp. capazes de promover o controle biológico da murcha de fusarium do tomateiro desenvolveu-se o presente trabalho com os seguintes objetivos: a) caracterizar funcionalmente (atividade celulolítica proteolítica, pectinolítica, quitinolítica, produção de sideróforos e de ácido cianídrico) as estirpes de *Bacillus* spp. isoladas de tecidos de plantas de tomateiro com potencial antagonista à *Fol* e identificar os possíveis mecanismos envolvidos no antagonismo de *Bacillus* spp. a *Fol*; b) determinar, com base em testes *in vitro* estirpes de *Bacillus* spp. com atividade antagônica significativa a *Fol*; c) avaliar o potencial de estirpes de *Bacillus* spp. em promover o controle da murcha de fusário do tomateiro, em cultivares de tomate industrial e ensaio em condições de casa-de-vegetação; e e) avaliar os efeitos benéficos de *Bacillus* spp. em plantas de duas cultivares de tomate industrial.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tomateiro

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma dicotiledônea pertencente à família Solanaceae, assim como outras espécies de grande interesse como a batata, berinjela, jiló, pimentão e pimentas (GERSZBERG et al., 2015). É a hortaliça mais popular e está inserida na culinária de muitos povos de diferentes regiões do mundo. Seus frutos são versáteis quanto ao modo de consumo, seja *in natura* em diferentes pratos, como processados pela indústria para produção de diferentes derivados como extratos, molhos e sucos de tomate, ou ingrediente de vários produtos industrializados como condimentos, embutidos e sopas (CONSUEGRA et al., 2000; NAIKA et al., 2006; PERALTA et al., 2006).

Os principais produtores mundiais de tomate são a China seguido da Índia, Turquia e Estados Unidos. O Brasil ocupa a 10^a posição, com uma área de aproximadamente 54,2 mil hectares para produção de tomate de mesa e indústria. A produção de tomate nacional é estimada em 3.886.009 toneladas e a produtividade média é de 71,60 t/ha. Dentro do Brasil os maiores produtores são o Estado de Goiás, cuja produção é voltada essencialmente para a agroindústria, seguido de São Paulo e Minas Gerais. O Estado do Rio de Janeiro ocupa a 5^a posição no ranking de produção nacional, destinada predominantemente ao mercado de frutos *in natura* (SANTOS et al., 2022). Cerca de 37% da produção nacional de tomate é destinada à indústria e o custo de produção neste caso pode ser até 80% mais baixo (ORSI, 2022).

Embora o tomateiro seja uma planta naturalmente perene, é cultivada como anual e pode gerar altos rendimentos, o que aumenta o interesse por parte dos agricultores em seu cultivo (KAUL, 1991; NAIKA et al., 2006). A produção de tomate no Brasil é uma importante fonte de renda e ocupação da mão de obra rural, tanto no segmento *in natura* quanto na produção de tomate para indústria. A produção de tomate de mesa demanda grande contingente de mão de obra durante todo o ciclo até a comercialização. O tomate industrial, por sua vez, caracteriza-se pela alta mecanização, mas demanda mão de obra na fase de processamento (REIFSCHNEIDER et al., 2015).

Os relatos de diferentes autores apontam ser o tomateiro originário dos Andes, mais especificamente da região que abrange parte do Peru, Chile, Equador e Ilhas Galápagos (DE CANDOLLE, 1886; PERALTA et al., 2006), a partir de onde foi levado e difundido para toda a América tropical pelas civilizações que antecederam à dos Incas, Maias e Astecas. Os relatos também apontam que a espécie foi domesticada no México, que é reportado como centro de diversificação do tomateiro e de origem da espécie hoje cultivada. Do México, o tomateiro foi levado pelos espanhóis para a Europa, mas foi inicialmente rejeitada pelos europeus pois foi associada à mandrágora, solanácea tóxica e com altos teores de alcalóide (CAMARGO et al., 2006). O fruto passou a ter maior importância pois foi incorporado a algumas receitas na Itália (CONSUEGRA et al., 2000). A partir daí a cultura foi difundida para todo o mundo de tal forma a se tornar uma hortaliça cosmopolita. No Brasil, provavelmente, o tomateiro foi introduzido no início do século XX pelos portugueses, mas somente a partir da chegada dos imigrantes italianos e alemães passou a ter importância econômica (DA SILVA & BRITTO GIORDANO, 2000).

2.2 Murcha-de-fusário do tomateiro

Dentre as diferentes enfermidades que podem causar severas perdas à cultura do tomateiro está a murcha-de-fusário, causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersicum* (Scc.) Snyder e Hansen (*Fol*) (FILGUEIRA, 2003; PEREIRA & PINHEIRO, 2014) pertencente ao reino Fungi, filo Ascomycota, classe Sordariomycetes, ordem Hypocreales e família

Nectriaceae. Em função das variações na habilidade patogênica, apesar da semelhança morfológica, a espécie *F. oxysporum* é também subdividida em nível infraespecífico em distintas *formae speciales* (f. sp.) em função da habilidade de infectar diferentes espécies hospedeiras, sendo a patogênica ao tomateiro identificada como *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (JONES & WOLTZ, 1968; CORRELL et al., 1991). *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* apresenta, ainda, especificidade fisiológica a distintas variedades do tomateiro portadoras de distintos genes "I" de resistência que conferem resistência aos distintos genes *Avr* de avirulência do patógeno. Até então já foram identificadas três raças fisiológicas do patógeno, raças 1, 2 e 3, diferenciáveis pela capacidade de infectar plantas com diferentes loci de resistência, conhecidas como variedades diferenciadoras (REIS et al., 2005; SRINIVAS et al., 2019; Oliveira et al., 2021).

O fungo *F. oxysporum* é um patógeno hemibiotrófico e com grande capacidade de sobrevivência no solo, seja pela produção de esporos de resistência, os clámidósporos, como pela atividade saprofítica. Morfológicamente, caracteriza-se pela produção de macroconídios, microconídios e clámidósporos (MA et al., 2013) pela formação de esporodóquios pelo agrupamento de conidióforos (KUROZAWA & PAVAN, 2005). Os macroconídios são hialinos, alantoides, com 2 a 4 septos, com paredes finas; os microconídios são hialinos, elípticos podendo ter uma ou duas células; os clámidósporos são estruturas de resistência arredondadas que possuem uma a duas células com parede espessa e lisa (AGRIOS, 2005; MA et al., 2013; PEREIRA & PINHEIRO, 2014).

O patógeno penetra os tecidos da planta através do sistema radicular sendo este processo facilitado pela presença de ferimentos diversos, que podem ser causados pelos tratos culturais e ataque de nematoides, bem como por aberturas naturais decorrentes da emissão de raízes secundárias. Em seguida, infecta e coloniza os vasos do xilema obstruindo-os, em virtude da proliferação de hifas e conídios do patógeno e da reação da planta com a formação de géis e tiloses, e causando necroses pela produção de toxinas (SRINIVAS et al., 2019). As toxinas produzidas e a obstrução dos vasos do xilema levam a uma série de sintomas típicos devido a interrupção do fluxo normal de água e nutrientes que consequentemente geram necrose dos vasos, amarelecimento de folhas, murcha parcial e generalizada e morte das plantas em casos mais severos (MCGOVERN, 2015).

A infecção, colonização e desenvolvimento dos sintomas é caracterizado por uma série de eventos desde a germinação dos esporos, macro e microconídios e clámidósporos, presentes no solo ou substrato. A germinação destes esporos, estimulada pela liberação de exsudatos radiculares, resulta na formação de hifas até a adesão à estrutura radicular da planta e formação das hifas infectivas seguido de penetração através dos pelos radiculares e aberturas naturais ou de ferimentos (BECKMAN, 1987; KUROZAWA & PAVAN, 2005), seguido de crescimento das hifas nos espaços intercelulares do córtex da raiz até atingir o xilema. Uma vez atingido o xilema, ocorre o crescimento micelial e esporulação do patógeno e subsequente carreamento de microconídios através do fluxo ascendente de água e nutrientes (BECKMAN, 1987; SRINIVAS et al., 2019). A colonização do xilema com a produção de hifas e esporos e liberação de toxinas somado às respostas da planta, produção de géis e formação de tiloses, resultam na obstrução dos vasos do xilema (SRINIVAS et al., 2019) e danos ao fluxo normal de água e nutrientes. Este processo resulta em uma série de respostas da planta que resultam em sintomas típicos como necrose dos vasos, murcha temporária, amarelecimento das folhas mais velhas, necrose das margens do limbo foliar ou total, e murcha generalizada e morte da planta (MCGOVERN, 2015). O estresse hídrico e a deficiência nutricional resultantes levam ainda ao subdesenvolvimento das plantas, aborto floral e maturação precoce dos frutos e morte das plantas. Pode-se ainda observar atrofia e comprometimento das raízes e, com o tempo, apodrecimento e morte da planta (SRINIVAS et al., 2019).

2.3 Epidemiologia e controle da murcha-de-fusário do tomateiro

Como a maioria das doenças causadas por patógenos habitantes do solo, as plantas sintomáticas distribuem-se em reboleiras nos diferentes talhões ou áreas da lavoura em função da localização ou distribuição do inóculo do patógeno no solo (REIS & LOPES, 2007). A introdução do patógeno na área normalmente se dá por meio de transplante de mudas infectadas e uso de máquinas, implementos ou ferramentas contaminadas. A sua dispersão, a pequenas e médias distâncias dentro das áreas se dá pelo carreamento ou arraste de solo, seja nas práticas de cultivo, como pela erosão ou arraste de poeira pelo vento (LOPES et al., 2003; KUROZAWA & PAVAN, 2005; JOSH, 2018). A dispersão entre áreas, ou a médias e longas distâncias, ocorre pelo compartilhamento de máquinas e implementos contaminados e pelo uso de sementes e mudas infectadas.

O processo de infecção e colonização é favorecido por temperaturas médias a altas para a cultura - de 21° C à 33° C, com ótimo em cerca de 28° C (KUROZAWA & PAVAN, 2005; SRINIVAS et al., 2019) e solos arenosos e ácidos (ZAMBOLIM & VENTURA, 1993; REIS & LOPES, 2007). Ferimentos radiculares pelas capinas ou cultivo mecânicos e ataque de nematóides fitoparasitas também favorecem o processo infeccioso (BECKMAN, 1987; LOPES et al., 2003).

Ao longo do ciclo do tomateiro, a dispersão do patógeno entre plantas é restrita e a intensidade da doença correlaciona-se diretamente com a quantidade e distribuição inicial do inóculo, condições de ambiente e nível de resistência da cultivar plantada (GOSME & LUCAS, 2009; MCGOVERN, 2015). Desta forma, o seu controle deve ser baseado em um conjunto de medidas e práticas preventivas classificadas como controle cultural, físico e genético. O controle químico apresenta aplicação restrita para a murcha de fusarium (BORRERO et al., 2004).

2.3.1. Controle cultural

O controle cultural de doenças busca favorecer o desenvolvimento do hospedeiro em detrimento ao do patógeno através do manejo do solo e das condições de cultivo antes, durante e pós-implantação da cultura (MIZUBUTI & MAFFIA, 2013). O controle cultural engloba, sobretudo, práticas de caráter preventivo ou profiláticas elaboradas com base no conhecimento do ciclo de vida do patógeno, da cultura e da dinâmica da doença e que visam restringir a introdução do patógeno na área e, uma vez introduzido, limitar a sua dispersão e/ou suprimir a atividade do patógeno e/ou restringir o processo de infecção e colonização (PALTI, 1981; MIZUBUTI & MAFFIA, 2013). Por ser um patógeno com grande habilidade de sobrevivência no solo, uma vez introduzido, sua erradicação é difícil (SRINIVAS et al., 2019).

Dentre as medidas preventivas mais importantes estão a aquisição de material propagativo saudável (MCGOVERN, 2015); uso de máquinas, implementos e ferramentas limpos e sem riscos de transporte do patógeno; redução da movimentação de máquinas e o revolvimento do solo, especialmente de áreas contaminadas, e adoção de práticas de conservação de solo visando minimizar os processos erosivos (VÁSQUEZ-RAMÍREZ & CASTAÑO-ZAPATA, 2017). A identificação precoce e a remoção de plantas infectadas ao longo do ciclo e; a destruição/remoção dos restos culturais ao final do ciclo da cultura e o pousio ou rotação com espécies não hospedeiras, até novo plantio da cultura, devem ser observados visando reduzir o potencial de inóculo no solo (AJILOGBA & BABALOLA, 2013). A adoção de sistemas de irrigação por gotejamento ou microaspersão em relação ao de aspersão ou sulco também é preconizada sob a justificativa de se reduzir o impacto de gotas d'água no solo e o arraste de partículas e assim a dispersão de inóculo (VÁSQUEZ-RAMÍREZ & CASTAÑO-

ZAPATA, 2017). No entanto, Lopes et al. (2006) alertam para eventuais efeitos adversos devido à saturação temporária no solo em contato com o gotejador o que favoreceria o crescimento mais localizado das raízes.

Além destes pontos, as características físicas, químicas e biológicas do solo também são fatores relacionados ao maior ou menor desenvolvimento da doença e o manejo do solo e de sua fertilidade estão entre as estratégias preconizadas para o controle da doença. A correção da acidez com elevação do pH para 5,5-6,0, o uso correto de adubos nitrogenados, com aplicação de fontes à base de N-NO_3^+ em relação à N-NH_4^+ (CARVALHO et al., 2005) e o fornecimento de Cálcio (Ca) podem contribuir para a redução das taxas de infecção do tomateiro pelo patógeno (ZAMBOLIM & VENTURA, 1993; MICHEREFF et al., 2005).

2.3.2. Controle físico

Embora não seja utilizado em escala, o controle físico, que inclui a utilização de energia física, como calor e radiação para eliminar patógenos de partes vegetais ou de substratos, também é citado como estratégia para controle da doença (MICHEREFF et al., 2005; MIZUBUTI & MAFFIA, 2013). Dentre os métodos físico citados para supressão do patógeno estão o tratamento térmico via solarização ou vaporização. A solarização, procedimento mais acessível, não erradica o patógeno do solo, mas reduz a sua população por inativação térmica o que contribuiu para redução da severidade da doença e melhoria do crescimento da planta (MONTEALEGRE et al., 1997; IOANNOU, 2000; BARAKAT & AL-MASRI, 2012) pela redução da densidade de esporos viáveis de *Fusarium* spp. nas camadas superficiais do solo. A vaporização, apesar de citada por Jones e Woltz (1968) e por Weststeijn (1973), não tem sido reportada em trabalhos mais recentes para o controle da murcha de fusarium, provavelmente, por possuírem algumas limitações. A vaporização exige equipamentos, eletricidade, água, gerando maiores gastos (JONES & WOLTZ, 1968). A solarização, por sua vez, exige a aquisição de lona, depende do clima e da incidência dos raios solares e requer um período maior de aplicação (IOANNOU, 2000).

2.3.3. Controle químico

O controle químico de doenças de plantas é feito através da utilização de agroquímicos, ou pesticidas como os fungicidas, bactericidas e nematicidas, e os inseticidas e acaricidas devido ao seu efeito indireto através do controle de vetores de vírus (MICHEREFF, 2001).

O controle químico de doenças causadas por patógenos de solo pode ser visto como uma ação preventiva visando a redução do inóculo inicial no solo ou substrato por meio da aplicação de sanitizantes ou da fumigação utilizando-se os produtos voláteis (VÁSQUEZ-RAMÍREZ & CASTAÑO-ZAPATA, 2017). Como *Fol* possui grande capacidade de sobrevivência, a desinfestação de todos as superfícies em que o patógeno possa se instalar, como sementes de tomate, ferramentas de manejo da lavoura, vasos e estacas são úteis. Neste conjunto são utilizados produtos como NaOCl , H_2O_2 , O_3 e amônia quaternária (MCGOVERN, 2015).

A fumigação com brometo de metila foi muito utilizada nos Estados Unidos, Europa e no Brasil, até o produto ser proibido (MCGOVERN, 2015). No Brasil, atualmente, o único produto fumigante registrado para o controle de murcha de fusarium, pré-plantio, produto à base de metam-sódico (AGROFIT, 2022). Fungicidas à base de procloraz e bromuconazol demonstraram ação no controle da doença desde que aplicados na fase inicial da doença (AMINI E SIDOVICH, 2010). No entanto, o uso de fungicidas e a utilização da prática de fumigação do solo no manejo da murcha-de-fusário tem uma série de inconvenientes como o alto custo, baixa eficiência, pressão de seleção que pode facilmente favorecer a seleção de

estirpes resistentes, além dos impactos negativos no ambiente pela não especificidade e potencial poluente, dependendo da molécula (AGRIOS, 2005; MCGOVERN, 2015; BAWA, 2016).

2.3.4. Controle genético

A resistência genética é a principal estratégia para o controle da maioria das doenças de plantas devido ao fato de ser de baixo custo, de baixo impacto ambiental, simples e eficiente em reduzir perdas causadas por várias doenças (FRY, 1982; MIZUBUTI & MAFFIA, 2013). É uma das estratégias mais importantes para doenças como as murchas vasculares e virozes devido à não ou pouca disponibilidade de outros meios de controle eficientes (FRY, 1982). A planta resistente possui ou produz mecanismos físicos ou químicos de restrição ao processo de infecção e colonização pelo patógeno e, consequentemente, de desenvolvimento da doença (FRY, 1982).

Dentre os dois tipos clássicos de resistência de plantas definidos por Van der Plank (1963), resistência horizontal (RH) e resistência vertical (RV), a segunda tem sido a mais explorada para o desenvolvimento de cultivares de tomateiro resistentes à murcha de fusarium. Estas cultivares tem sido obtidas pela introgressão de genes de resistência, simples e raça específicos, em cultivares comerciais (REIS et al., 2004b). Até então, somente foram identificadas três raças de *Fol*, as raças 1, 2 e 3. Os genes que controlam a resistência do tomateiro a *Fol* são raça específicos e denominados I-genes: I-1 controla a resistência à raça 1; I-2 controla a resistência à raça 2; I-3 controla a resistência à raça 3, enquanto I-7 é efetivo no controle de todas as raças. Estes I-genes foram encontrados em acessos de outras espécies do gênero *Solanum*: I-1 em *S. pimpinellifolium*; I-2 em um híbrido natural entre *S. lycopersicum* x *S. pimpinellifolium*; I-3 e I-7 em *S. pennellii* (NOGUEZ & TOKESHI, 1974; REIS et al., 2004a; SAIN & REP, 2015; GONZALEZ-CENDALES et al., 2016; JI et al., 2018). A resistência conferida segue o padrão da interação gene a gene (FLOR, 1956), onde os genes *I* de imunidade interagem com genes *Avr* de avirulência do patógeno (BIJU et al., 2017). Ou seja, os genes I-1, I-2 e I-3, conferem resistência específica às raças 1, 2 e 3 de *Fol*, respectivamente, portadoras respectivamente dos genes AVR1, AVR2, AVR3 (MA et al., 2013). A utilização de cultivares de tomateiro resistentes à murcha de fusarium somente é eficiente se a cultivar plantada possuir o(s) gene(s) de resistência à(s) raça(s) de *Fol* presentes na área de cultivo (REIS et al., 2004a).

O gene *I-1* foi introduzido em variedades comerciais de tomateiro o que resultou em controle satisfatório da doença até o aparecimento da raça 2 nos Estados Unidos, em 1945 (ALEXANDER & TUCKER, 1945). O controle da doença, causada por esta nova raça foi possível graças à identificação e incorporação em novas cultivares do gene *I-2* (NOGUEZ & TOKESHI, 1974; REIS et al., 2004a). A partir do surgimento na Austrália em 1978 e posterior dispersão da raça 3, genes de resistência a esta raça passaram a ser pesquisados e incorporados em novas cultivares. Esta raça é de introdução mais recente no Brasil, relatada pela primeira vez em Venda Nova do Imigrante, ES, por Reis et al. (2005), mas vem sendo gradativamente observada em vários outros municípios produtores de tomate como nos estados do Rio de Janeiro (REIS e BOITEUX, 2007; OLIVEIRA et al., 2021); Bahia (BARBOZA et al., 2013), Minas Gerais (GONÇALVES et al., 2013), Goiás, São Paulo, Ceará (GONÇALVES et al., 2021). A raça 3 de *Fol* foi detectada e relatada em áreas de produção de tomate para indústria em Juvenilia - MG, já que anteriormente, a murcha de fusarium havia sido pouco relatada nestas cultivares. E embora o uso de cultivares resistentes à raça 3 de *Fol* venha crescendo em áreas

de produção de tomate de mesa no Brasil, o mesmo não acontece para o segmento de tomate industrial (TREICHEL, 2016; GONÇALVES et al., 2021).

2.3.5. Controle biológico

O controle biológico de doenças de plantas, feito por meio de microrganismos que atuam por meio de um ou mais mecanismos de biocontrole, tem sido investigado como uma alternativa aos outros métodos de controle. Estes agentes incluem fungos e bactérias (MCGOVERN, 2015) e os mecanismos envolvidos no controle são: antibiose, competição, parasitismo, indução de resistência no hospedeiro, hipovirulência, dentre outros (LEMANCEAU et al., 1993; FUCHS et al., 1997; DUILJFF et al., 1998; PATEL & SARAF, 2017).

A grande diversidade de mecanismos de ação e o menor impacto ambiental são algumas das vantagens do controle biológico em relação a controle químico (CAWOY et al., 2011). Além disso, os agentes de biocontrole podem ser utilizados individualmente ou dentro de programas de manejo integrado, sendo aplicados simultaneamente ou em rotação com outros produtos de controle, quando compatíveis (ROMERO et al., 2007). Além dos efeitos diretos sobre os fitopatógenos (CAWOY et al., 2011), alguns destes bioagentes podem ter efeitos benéficos adicionais na nutrição e promoção de crescimento das plantas, contribuindo indiretamente no controle das doenças e na redução dos danos a fatores de stress (OLANREWAJU et al., 2017).

Dentre os agentes de biocontrole que tem se mostrado eficientes no controle da murcha de fusarium do tomateiro estão: estirpes avirulentas de *F. oxysporum* que podem ter efeito antagônico contra diversas estirpes patogênicas de *Fol* (ALABOUVETTE et al., 1996, SILVA & BETTIOL, 2005); estirpes de *Trichoderma harzianum* e de *T. asperellum* que tem sido associadas à redução da incidência da murcha de fusarium do tomateiro e ao aumento do crescimento e acúmulo de biomassa da planta (SUNDARAMOORTHY & BALABASKAR, 2013; PATEL & SARAF, 2017); *Penicillium oxalicum* por indução de resistência (DE CAL et al., 1997). No caso de bactérias, são citadas *Bacillus subtilis*, *B. circulans*, *B. cereus*, *B. megaterium* (CARRER FILHO et al., 2015; ROCHA et al., 2017; JANGIR et al., 2018; MEDEIROS & BETTIOL, 2021) e *Pseudomonas* spp. (DUILJFF et al., 1998; ASHA & NIRANJANA, 2011). A utilização de diferentes microrganismos antagonistas em associação pode otimizar o controle biológico da murcha-de-fusário do tomateiro em comparação à utilização de organismos isolados. Por exemplo, a associação de estirpes não patogênicas de *F. oxysporum* com estirpes de *P. fluorescens* é mais eficiente no controle da murcha de fusarium que o uso apenas de *P. fluorescens* (ALABOUVETTE et al., 1993). Este efeito, porém, nem sempre é observado (LARKIN & FRAVEL, 1998). Segundo estes autores, a combinação de isolados de *Fusarium*, estirpes bacterianas e *Gliocladium* spp., não melhoraram nível de controle quando comparando a ação individual de estirpe avirulenta de *F. oxysporum*. No mundo já existem formulações de biocontrole registrados para controle da murcha de fusarium do tomateiro desde 1998, alguns são o SoilGard® e RootShield®, compostos de *Gliocladium virens* e *T. harzianum* respectivamente (LARKIN & FRAVEL, 1998). No Brasil o registro é mais recente e os produtos liberados são Powerfung® (*T. asperellum*), Serenade® (*B. subtilis* linhagem QST 713), Trianum DS® (*T. harzianum*), Trichotrix® (*T. asperellum*) e Walker® (*T. harzianum*) (AGROFIT, 2022).

2.3.6. *Bacillus* spp. e controle biológico de doenças de plantas

Dentre os microrganismos potenciais para o biocontrole estão as bactérias do gênero *Bacillus* - bactérias em formato de bastonetes, Gram-positiva e que formam endósporos (HARWOOD et al., 2013; PRABHUKARTHIKEYAN, 2014). Essa espécie engloba rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (RPCPs) e é um dos gêneros bacterianos mais estudados como agentes de biocontrole bacterianos além de compor muitos produtos de biocontrole atualmente disponíveis (ONGENA et al., 2007; CAWOY et al., 2011; BIZOS et al., 2020; OLANREWAJU et al., 2017).

Diversas características valiosas destacam *Bacillus* spp. como eficientes agentes antimicrobianos: possuem uma grande diversidade genética e podem ser encontrados em nichos ecológicos distintos; são organismos anaeróbios facultativos e por isso, podem sobreviver mesmo na ausência de oxigênio (CAWOY et al., 2011); produzem endósporos que garantem a sobrevivência deste microrganismo no solo (ROMERO et al., 2007); possuem uma série de mecanismos de ação no controle de doenças. Essas características conferem às espécies de *Bacillus* capacidade de colonização do solo em diversas condições (ONGENA et al., 2007). A produção de esporos favorece a utilização de espécies de *Bacillus* no preparo de formulações comerciais de biocontrole. Pois, além de garantir maior vida útil ao produto, garante também uma maior flexibilização quanto às condições de armazenagem do produto (ONGENA et al., 2007; CAWOY et al., 2011).

Espécies de *Bacillus* podem atuar diretamente, por meio da competição por nicho/substrato e antibiose, ou indiretamente induzindo resistência sistêmica no hospedeiro (ONGENA et al., 2007; LANNA FILHO et al., 2010). A antibiose é relatada como um dos principais mecanismos envolvidos na supressão de doenças por *Bacillus* spp. que se destacam por sua produção de compostos com atividade inibitória, como os bioativos zwittermicina, kanosamine, bacillaeno, lantibióticos e lipopeptídeos e as enzimas degradadoras da parede celular, quitinases e glucanases (CAWOY et al., 2011).

Bacillus spp. possuem características que as tornam potencialmente competitivas. No entanto, existem pouca evidência científica que destaque a magnitude da competição na supressão de doenças por esta bactéria (CAWOY et al., 2011). Porém, estudos recentes já destacam a atuação de *Bacillus* spp. na produção de compostos envolvidos na competição por Fe, os sideróforos, que reduzem a disponibilidade deste nutriente para os fitopatógenos (BENEDUZI et al., 2012).

Algumas estirpes de *Bacillus* spp. podem ainda estimular mecanismos de defesa das plantas fitopatógenos. A ativação destes mecanismos gera uma série de respostas fisiológicas nas plantas que culminam em uma redução significativa do processo de infecção (KLOEPPER et al., 2004; ONGENA et al., 2007).

2.3.6.1 *Bacillus* endofíticos no controle biológico de murcha de fusarium do tomateiro

Os organismos endofíticos englobam uma série de microrganismos endossimbiontes que vivem no interior dos tecidos das plantas sem causar danos, mas com potencial efeito na supressão de doenças e na promoção do crescimento das plantas (ARNOLD & LUTZONI, 2007; KHAN et al., 2015). Devido à esta capacidade, estes organismos têm sido bastante estudados visando a sua aplicação na agricultura.

A utilização de *Bacillus* endofíticos tem sido estudada e apontada como potencialmente eficiente no controle de *Fol.* Shahzad et al. (2017) demonstraram o papel de *B. amylolyquefaciens RWL-1*, isolados de sementes de arroz, na redução da severidade da murcha-de-fusário e na promoção do crescimento do tomateiro. Este efeito foi associado à indução da resistência das plantas ao patógeno e à produção de ácidos orgânicos, regulação de aminoácidos

e modulação hormonal. Rocha et al. (2017) também citam efeito antagonista decorrente da atividade proteolítica ou celulolítica de estirpes de *Bacillus* spp., isoladas de tomateiro, às raças 1, 2 e 3 de *Fol*. No ensaio *in vivo* ainda foi possível selecionar pelo menos duas estirpes bacterianas potenciais para o controle de cada uma das três raças testadas. Além disto, muitas das estirpes bacterianas testadas promoveram crescimento nas plantas de cultivares de tomateiro em que foram inoculadas. Em um ensaio *in vitro*, Elanchezhiyan et al. (2018) observaram um aumento no vigor das plântulas provenientes de sementes de tomate tratadas com suspensão de *B. amyloliquefaciens* FZB 24, indicando uma atividade promotora do crescimento. Essa estirpe se destacou em relação a outros isolados nos ensaios de controle *in vitro* de *Fol*, e ainda na produção de antibióticos peptídicos e por isso foi levada para um teste *in vivo* em casa de vegetação, onde novamente demonstrou desempenho superior quando comparada ao controle, que eram plantas tratadas ou não com carbendazim. As plantas tratadas com o bioinoculante FZB 24, apresentaram menor incidência de murcha e maior crescimento vegetal. Posteriormente, ensaios mostraram a produção de enzimas envolvidas na expressão gênica relacionada à atividade de defesa da planta, indicando uma possível atuação de lipopeptídeos como elicitores da resistência sistêmica da planta, embora estes também possam ter atuado a partir da antibiose direta.

As estirpes SV39, SV41, SV44, SV65 e SV104 de *Bacillus* spp. testadas por Abdallah et al. (2017) inibiram significativamente o crescimento de conídios e o diâmetro das colônias de *Fol* *in vitro*, quando comparados aos controles. Em casa de vegetação todas as estirpes testadas resultaram em redução significativa na severidade da murcha de fusarium, além de proporcionarem acréscimos no crescimento do tomateiro, quando comparados ao controle. A atividade antagônica foi associada a produção de quitinases e lipopeptídeos pelas estirpes bacterianas.

2.3.6.2 Peptídeos antimicrobianos produzidos por *Bacillus* sp.

Como já mencionado, *Bacillus* spp. produzem variados compostos bioativos com potencial no controle biológico, como enzimas hidrolíticas, bacteriocinas, ácidos orgânicos, e os compostos peptídicos, destacados por Cawoy et al. (2011) como a classe predominante de compostos antimicrobianos produzidos por estas espécies. Neste grupo estão incluídos os lipopeptídeos e sideróforos, que são sintetizados por um complexo de enzimas modulares chamado de sintetasas de peptídeos não ribossomais (NPRS) e por sintases de policetídeos (PKS) (CROSA e WALSH, 2002; ONGENA & JACQUES, 2008).

Os lipopeptídeos são peptídeos de baixo peso molecular que exibem uma ampla ação antimicrobiana, atuando com propriedades surfactantes (ONGENA & JACQUES, 2008). Dentre os mais importantes no biocontrole de patógenos estão surfactina, iturina e fengicina. Os lipopeptídeos podem atuar indiretamente via indução de resistência na planta hospedeira,

como demonstrado por Ongena et al. (2007), ou com efeito direto aos fitopatógenos, danificando suas membranas biológicas como apontado por Romero et al. (2007). Além disso, esses compostos podem estar envolvidos na formação de biofilmes por *Bacillus* spp. nas superfícies radiculares e do solo, e na motilidade destas bactérias no solo, influenciando diretamente na capacidade de colonização nas raízes e no solo (ONGENA & JACQUES, 2008).

Os sideróforos são compostos quelantes com baixa massa molecular, produzidos por alguns microrganismos principalmente sob condições limitantes de Fe (SCHWYN & NEILANDS, 1987), pois permitem ao microrganismo produtor, acessar várias fontes de Fe, conferindo a este uma vantagem competitiva (BENEDUZI et al., 2012). Estes compostos

também são fontes de Fe para as raízes vegetais, que podem absorver complexos férricos de sideróforos, e por isso, atuam também na promoção de crescimento vegetal (YU et al., 2011).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Para selecionar microorganismos eficientes no controle biológico de murcha de fusarium em tomate industrial, uma série de etapas foram realizadas visando triar, caracterizar e identificar estirpes com potencial ação antagonista.

3.1 Obtenção dos microrganismos

3.1.1. Obtenção dos isolados de *Bacillus* sp.

Utilizaram-se isolados de *Bacillus* spp. preservados no Laboratório de Genética e Bioquímica da Embrapa Agrobiologia. Estes isolados são provenientes de áreas cultivadas com tomateiro no município de Nova Friburgo (RJ) contaminadas com *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*) (Rocha et al., 2017). Desta coleção, selecionaram-se aleatoriamente 52estirpes representativas de diferentes locais de coleta e localização na planta (Tabela 1).

Os isolados das respectivas estirpes bacterianas, preservados em tubos com glicerol, foram repicados para meio Luria Bertani Miller líquido (LB - Kasvi®), e incubados sob agitação em câmara incubadora com agitação orbital (*shaker*) à 30°C por 24 horas. Em seguida, as culturas foram riscadas em placas de Petri contendo meio LB sólido (Kasvi®, 15g/L de ágar) e incubadas à 30°C em estufa, durante 24 horas. As culturas obtidas foram analisadas e aquelas que apresentaram características morfológicas típicas de *Bacillus* sp. foram selecionadas. Destas, 47 identificadas como compatíveis morfologicamente com a descrição de *Bacillus* sp., com excessão das estirpes 49, 56, 82, 105 e 156, foram transferidas para tubos de ensaio com tampa rosqueável contendo meio LB sólido e, em seguida, preservadas sob camada de óleo mineral, para serem utilizadas nas etapas posteriores do trabalho (Tabela 1). As estirpes foram renomeadas para DEST e a sequência numérica apresentada a seguir.

Tabela 1. Origem de isolados de *Bacillus* spp. obtidos de plantas de tomateiro coletadas em lavouras no município de Nova Friburgo, RJ.

Informações sobre a planta e local de coleta	Isolados da parte aérea	Isolados da raiz
Planta assintomática, Serra Velha	5, 6, 7, 9, 19, 34, 38, 41, 44	23, 30, 31, 46, 49, 50
Planta assintomática, Rio Grande	53, 55, 56, 78, 82, 83, 85	59, 60, 61, 63, 66, 99, 105, 112
Planta assintomática, Local indefinido	118, 121, 123, 128, 132	136, 138, 139, 142
Planta necrosada, Local indefinido	149, 152, 164, 169, 170, 172, 174	176, 181, 182, 183, 186, 189

3.1.2. Isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Utilizaram-se isolados de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* mantidos no Laboratório de Epidemiologia e Patologia de Sementes (LabEPS) do Departamento de Fitotecnia, Instituto de Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) (Tabela 2). Os referidos isolados são oriundos de Nova Friburgo (OLIVEIRA et al., 2021) e Paty de Alferes - Rio de Janeiro (COSTA LISBOA, não publicado) (Tabela 2). Os isolados provenientes de Nova Friburgo são da raça 3 do patógeno e estavam preservados em tubos contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA) e óleo mineral. Para cada ensaio, foram recuperados a partir de repiques para placas de Petri contendo meio BDA (Kasvi®), mantidos em câmara de crescimento (BOD) a 25°C, com fotoperíodo de 12 horas, durante 7 a 14 dias.

Os isolados oriundos do município de Paty de Alferes, RJ, foram obtidos a partir de isolamentos feitos de tecidos infectados de plantas de tomateiro. Para isolamento, coletaram-se fragmentos do xilema, seguindo-se de assepsia em álcool 70% por trinta segundos e em hipoclorito de sódio (1%) por três minutos (ALFENAS et al., 2006). Posteriormente os fragmentos foram lavados com água destilada esterilizada e transferidos para placas de Petri contendo meio BDA, que foram incubadas em BOD a 28°C, fotoperíodo de 12 horas. Após 14 dias, foram analisados quanto às características morfológicas das colônias, das hifas, de clámidósporos e dos macro e microconídios após observação sob microscópio óptico. Em seguida, as culturas identificadas como sendo compatíveis com a descrição para *Fol* (MANIKANDAN et al., 2018) foram pré-selecionados e repicados para tubos de ensaio e armazenados sob refrigeração a 4°C em geladeira.

Tabela 2. Relação de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* com respectivos códigos de identificação, local de coleta e data das coletas.

Ordem	Código do isolado	Região de coleta	Data da coleta
1	FUS 1302	Nova Friburgo-RJ	2014
2	FUS 1405	Nova Friburgo-RJ	2014
3	FUS 2903	Nova Friburgo-RJ	2014
4	FUS 3302	Nova Friburgo	2014
5	FUS 08.2	Paty de Alferes-RJ	2019
6	FUS 02.4	Paty de Alferes-RJ	2019
7	FUS 04.1	Paty de Alferes-RJ	2019
8	FUS 03.1	Paty de Alferes-RJ	2019
9	FUS 02.3	Paty de Alferes-RJ	2019
10	FUS 07.2	Paty de Alferes-RJ	2019
11	FUS 05.2	Paty de Alferes-RJ	2019
12	FUS 152/12	Nova Friburgo-RJ	2014

3.2 Caracterização dos isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* quanto à patogenicidade

Para confirmar a patogenicidade dos isolados de *Fol*, sementes de tomateiro das cultivares Clause HM7885 e Heinz 9553 foram semeadas em bandejas de polietileno contendo substrato CarolinaSoil® Hortaliças, seguido de desbaste visando manter uma muda por célula. Quando as mudas apresentavam de 2 a 3 pares de folhas definitivas, foram removidas e lavadas para remoção do substrato aderido às raízes, seccionadas a cerca de 1,0 cm da proximidade distal e deixadas em repouso por 10 minutos sobre folhas de papel toalha visando um leve estresse hídrico. Posteriormente, sete mudas de cada cultivar foram inoculadas com os isolados do patógeno apresentados na Tabela 2 (exceto FUS 1302 que perdeu a capacidade de crescimento em meio BDA ao longo dos experimentos e foi descartado), mais um tratamento testemunha.

Utilizaram-se suspensões de conídios, preparadas a partir das culturas dos respectivos isolados, cultivados em placas de Petri contendo o meio BDA em BOD a 27°C e 12 horas de fotoperíodo por 14 dias. Para preparo da suspensão de conídios, adicionou-se água destilada esterilizada às respectivas placas seguido de raspagem com o auxílio de um pincel de cerdas macias, previamente esterilizados. Em seguida, transferiram-se as suspensões para um bêquer de 500 mL. Após filtração em gaze esterilizada, contabilizou-se o número de esporos em câmara de Neubauer visando o ajuste da concentração para $1,0 \times 10^6$ microconídios mL⁻¹. A inoculação foi feita por meio de submersão das raízes das mudas nas respectivas suspensões de conídios onde permaneceram por vinte minutos. As plantas testemunhas foram inoculadas com água destilada esterilizada. Em seguida, as mudas foram transplantadas para tubetes de polietileno (100 cm³) contendo substrato Multiplant® Hortaliças.

As mudas inoculadas foram mantidas em casa de vegetação na Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ, no mês de fevereiro de 2021. Aos 21 dias após a inoculação, as mudas foram avaliadas visualmente visando identificar sintomas indicativos de murcha-de-fusário e, em seguida arrancadas para avaliação da presença de necrose nos vasos do xilema, medição da

extensão da necrose (EN) e da altura total da haste (AH). Com base nestas medidas, calculou-se a porcentagem de infecção vascular (PIV%) pela relação (EN/AH) * 100 (CARVALHO et al., 2005). Determinaram-se, ainda, a incidência de mudas infectadas, o tempo para o aparecimento de sintomas e a severidade da doença utilizando-se escalas de Reis et al. (2004b), adaptada de Santos (1997). Com base nos resultados, selecionaram-se os isolados de *Fol* e a cultivar a serem utilizados nos ensaios seguintes.

Utilizou-se o delineamento de blocos casualizados com sete repetições, sendo cada planta uma repetição. Os dados referentes a altura das plantas, considerando-se as cultivares isoladamente, foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas por meio do teste de Tukey à 5% de probabilidade ($p<0,05$). Realizou-se, ainda, análise de correlação entre a massa fresca da parte aérea e a porcentagem de infecção vascular. A análise estatística e a correlação foram realizadas por meio do software RStudio.

3.3 Seleção de isolados de *Bacillus* com atividade antagônica a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Nesta etapa efetuaram-se testes *in vitro* com o confronto de 49 estirpes bacterianas x quatro isolados de *Fol*. Esta etapa visou selecionar as estirpes promissoras para o controle da doença.

3.3.1. Pré-seleção das estirpes bacterianas com atividade antagônica pelo método de estrias paralelas

O teste de antagonismo *in vitro* de estirpes bacterianas x *Fol* foi feito em placas de Petri contendo o meio Batata-Dextrose-Agar (BDA) segundo o método descrito em Rocha et al. (2017).

As 47 estirpes de *Bacillus* (Tabela 1) foram cultivadas em placas de Petri contendo meio BDA (Himedia®) sob temperatura de 30°C por 24 horas. Em seguida, foram repicadas para tubos de ensaio contendo o meio LB líquido (Kasvi®) e incubadas novamente nas mesmas condições anteriores.

Quatro isolados de *Fol* (FUS 3302, FUS 2903, FUS 1405 e FUS 1302), foram cultivados em placas de Petri contendo meio BDA por sete dias, a 28°C e 12 horas de fotoperíodo. Estes isolados, foram utilizados em primeiro momento pois já estavam armazenados no laboratório.

Para o teste de confronto, alíquotas das respectivas culturas bacterianas foram distribuídas em duas estrias, paralelas e equidistantes, a 1,5 cm da borda das placas de Petri (90 cm de diâmetro) contendo meio BDA. Em seguida, no centro de cada placa, entre as duas estrias, depositou-se um disco de micélio (0,5 cm de diâmetro) da estirpe do patógeno a ser testado. As testemunhas constituíram-se de placas com estrias paralelas com meio LB líquido estéril + disco micelial do patógeno no centro. Logo após, as placas foram acondicionadas em BOD, com temperatura regulada para 30°C onde foram mantidas por 6 dias. Em virtude do grande número inicial de isolados bacterianos, optou-se pelo teste simples sem repetições.

Após seis dias de incubação, mediu-se o diâmetro, em duas posições perpendiculares, das colônias do fungo utilizando-se um paquímetro digital. A atividade antagônica ou inibitória foi determinada tendo como base o percentual de inibição relativa (IR) do crescimento micelial da colônia do patógeno nos respectivos tratamentos em comparação com a testemunha - placas com estrias riscadas a partir do meio LB + o isolado correspondente de *Fol*. Neste cálculo,

utilizou-se a relação entre a área da colônia do patógeno na presença e na ausência da bactéria em teste utilizando-se a fórmula de Menten et al. (1976):

$$I\% \text{ ou IR} = ((CPT-CPB) \times CPT^{-1}) * 100, \text{ onde:}$$

I% ou IR = Percentual de inibição relativa

CPT= Crescimento do patógeno na placa testemunha

CPB= Crescimento do patógeno na placa com a estirpe bacteriana em teste

As estirpes bacterianas que propiciaram mais de 50% de redução do crescimento micelial de pelo menos um dos quatro isolados do patógeno foram selecionadas para os testes posteriores.

3.3.2. Teste de antagonismo *in vitro* pelo método de estrias paralelas

Os isolados FUS3302, FUS2903, FUS1405 e FUS04.1 do fitopatógeno foram cultivados em meio BDA à 28°C por sete dias. As oito estirpes pré-selecionadas de *Bacillus* (DEST 30, DEST 31, DEST 38, DEST 60, DEST 78, DEST 83, DEST 132 e DEST 138) foram cultivadas em tubos de ensaio contendo meio LB à 30°C durante 24 horas. Passado este tempo, preparou-se suspensão bacteriana em meio LB para cada uma das estirpes a serem testadas e a concentração ajustada pela densidade ótica em espectrofotômetro considerando-se DO₆₀₀ (densidade ótica) = 0,2. Em seguida, a suspensão foi homogeneizada em agitador vórtex e riscadas sobre o meio BDA contido em placas de Petri (90 cm de diâmetro), em duas estrias paralelas equidistantes a 1,5 cm da borda das placas de Petri (90 cm de diâmetro) contendo meio BDA. Entre estas duas estrias, no centro de cada placa, foram depositados discos de micélio do isolado do patógeno. O mesmo procedimento foi realizado em meio LB sólido com as estirpes fúngicas FUS 3302, FUS 2903, FUS 1405. Como testemunhas, estrias paralelas de meio LB líquido estéril foram riscadas nos dois meios testados + disco de micélio do patógeno no centro das placas. As placas foram incubadas a 30°C por 6 dias.

Após este período avaliou-se o crescimento do patógeno medindo-se o diâmetro das colônias com um paquímetro digital, em dois sentidos perpendiculares. Com a média obtida, calculou-se a área da colônia do patógeno. Em seguida, calculou-se o percentual de inibição relativa (IR) do crescimento micelial pela fórmula de Menten et al. (1976), conforme descrito no item 3.3.1.

O experimento foi conduzido em triplicata em delineamento inteiramente casualizado e as médias de crescimento micelial de *Fol* foram submetidas à análise de variância (ANOVA), e posteriormente comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) por meio do software estatística Rstudio.

3.4 Caracterização funcional, *in vitro*, de estirpes de *Bacillus* com ação antagonista a *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*

3.4.1. Atividade celulolítica

A atividade celulolítica das estirpes bacterianas foi avaliada pelo método de iodine, descrito por Kasana et al. (2008). Cerca de 5,0 µL de cultura crescida em meio LB por 12 horas ($DO_{600} = 0,2$) foi distribuído em placas de Petri contendo meio ágar CMC [0,2% de NaNO₃, 0,1% de K₂HPO₄, 0,05% de MgSO₄, 0,05% de KCl, 0,2% de CMC forma sódica (carboximetilcelulose), 0,02% de peptona e 1,7% de ágar], em três séries (triplicata). As placas contendo as bactérias foram incubadas a 28°C por 48 horas e, em seguida, inundadas com

solução de iodine (2,0 g de KI, 1,0 g de iodo diluído em 300 mL de água destilada) durante 3-5 minutos. O excesso de solução foi drenado. A presença de halo ao redor das colônias bacterianas sinalizou resultado positivo para a atividade celulolítica. O controle positivo para a produção de enzimas celulolíticas foi a bactéria FORT 154 disponibilizada pelo laboratório de Genética e Bioquímica da Embrapa Agrobiologia.

A atividade enzimática foi determinada pelo método de Hankin e Anagnostakis (1975), através da relação entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia, consistindo no índice enzimático (IE). O índice enzimático foi calculado pela expressão: diâmetro médio do halo de hidrolise/diâmetro médio da colônia.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado e as médias submetidas à análise de variância (ANOVA), e posteriormente comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

3.4.2 Atividade proteolítica

A atividade proteolítica das estirpes de *Bacillus* foi avaliada seguindo o protocolo descrito por Saran et al. (2007). Após cultivo por 24 horas em meio LB líquido (30°C), tomaram-se 5 µL de suspensão bacteriana ($DO_{600} = 0,2$) que foram adicionados a 20 mL de meio de cultura Ágar Leite (20 g de ágar dissolvidos em 200 mL de água destilada; 20 g de leite em pó 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 – autoclavados separadamente antes do uso). As placas inoculadas foram incubadas por dois dias à 30°C. A atividade proteolítica foi analisada com base na presença ou não de halo claro ao redor da colônia, sendo a presença de halo indicativo de resultado positivo para a síntese de enzimas proteolíticas. O controle positivo para a produção de enzimas celulolíticas foi a bactéria FORT 154 cedida pelo laboratório de Genética e Bioquímica da EMBRAPA Agrobiologia.

A atividade enzimática foi determinada pelo método de Hankin e Anagnostakis (1975), através da relação entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia, consistindo no índice enzimático (IE). O índice enzimático foi calculado pela expressão: diâmetro médio do halo de hidrolise/diâmetro médio da colônia.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em triplicata e as médias submetidas à análise de variância (ANOVA) e, posteriormente, comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

3.4.3 Atividade pectinolítica

A capacidade das estirpes bacterianas produzirem enzimas pectinolíticas foi mensurada a partir da metodologia descrita por Bibi et al. (2018). As bactérias foram crescidas em meio LB líquido e 5 µL de suspensão bacteriana com densidade ótica ajustada ($DO_{600} = 0,2$) foram inoculados em placas de Petri contendo o meio de pectinase screening ágar ($NaNO_3$, 2 g/L; KCl, 0,5g/L; $MgSO_4$, 0,5 g/L; K_2HPO_4 1g/L; triptona, 0,5g/L; ágar, 20 g/L; pectina de maçã, 10 g/L), em triplicata. Posteriormente, as placas foram acondicionadas em estufa a 30 °C, por 48 horas. Após este período, as placas foram inundadas com solução de iodine (2,0 g de KI, 1,0 g de iodo diluído em 300 mL de água destilada) durante 3-5 minutos. O excesso da solução foi transferido para um bêquer e a presença de halo ao redor das colônias sinalizou resultado positivo para a produção de pectinases. O controle positivo utilizado foi a bactéria CR25 da espécie *Bacillus subtilis* (Laboratório de Genética e Bioquímica - Embrapa Agrobiologia).

A atividade enzimática foi determinada pelo método de Hankin e Anagnostakis (1975), através da relação entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia, consistindo no índice enzimático (IE). O índice enzimático foi calculado pela expressão: diâmetro médio do halo de hidrólise/diâmetro médio da colônia.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com 3 repetições, e as médias submetidas à análise de variância (ANOVA), e posteriormente comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p<0,05$).

3.4.4 Produção de ácido cianídrico (HCN)

A avaliação quanto à produção de ácido cianídrico foi feita utilizando-se o método descrito por Mariano e Souza (2016). Os isolados bacterianos previamente crescidos em placas de Petri a 30°C por 24 horas foram riscados em placas contendo o meio TrypticSoy Agar (TSA) 1/10, enriquecido com 4,4 g de glicina L⁻¹. Posteriormente, foram colocados papel filtro em formato circular impregnadas com solução de ácido pícrico (2,5 g de ácido pícrico; 12,5 g de Na₂CO₃; 1 L de água destilada) nas tampas das placas de Petri. Então as placas foram seladas com parafilm (Parafilm® M) e incubadas a 30°C por 48 horas. Como testemunha, ou controle positivo, foi utilizada a bactéria *Pseudomonas protegens* estirpes PS4 e PS5 que são provenientes da coleção do Laboratório de Genética e Bioquímica da Embrapa Agrobiologia. A alteração na coloração do papel de filtro do amarelo para marrom-alaranjado e a alteração da coloração da cultura para creme-escura foi usada como indicativo de produção de HCN.

O ensaio foi realizado em triplicata. E como é um dado qualitativo, a modificação da coloração do papel filtro de amarelo para marrom-alaranjado já indicava a capacidade das estirpes em produzir ácido cianídrico.

3.4.5 Atividade quitinolítica

A atividade quitinolítica das estirpes de *Bacillus* foi verificada por meio da metodologia descrita por Alexandre (2018). As bactérias foram crescidas em meio LB líquido e 5 µL inoculados ($DO_{600} = 0,2$) em placas de Petri contendo o meio de cultura com quitina coloidal [0,6% de fosfato dissódico (Na₂HPO₄); 0,3% de fosfato de potássio dibásico (K₂HPO₄); 0,1% de cloreto de amônio (NH₄Cl); 0,05% de cloreto de sódio (NaCl); 0,005% de extrato de levedura; 1,5% de ágar; 1% de quitina coloidal; e 0,001% do corante Calcofluor White M2R (1 g/L], em triplicata. Posteriormente, as placas foram acondicionadas em estufa a 30 °C, por cinco dias. Após este período, a presença de halos sob luz ultravioleta foi verificada por meio do equipamento Minfralight® LampMultiband UV (254-366nm) que permite a observação das colônias e halos de degradação de quitina. A bactéria *Paenibacillus illinoiensis* CB35 (Laboratório de Genética e Bioquímica - Embrapa Agrobiologia) foi utilizada como controle positivo do teste. A formação de halos de degradação ao redor das colônias indica resultado positivo para a produção de quitinases.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com 3 repetições, e as médias submetidas à análise de variância (ANOVA), e posteriormente comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p<0,05$).

3.4.6 Produção de sideróforos

Para avaliar a produção de sideróforos, foi utilizado o método de microplaca descrito por Arorae Verma (2017) e O-CAS baseado na metodologia de Schwyn e Neilands (1987), adaptada por Pérez-Miranda et al. (2007). Antes de iniciar ambos os ensaios, todas as vidrarias

utilizadas passaram por tratamento com ácido clorídrico (HCl) à 10% para remoção do ferro livre que poderia interferir nos resultados, sendo posteriormente lavadas com água deionizada.

Para o método de microplaca as bactérias foram cultivadas sob agitação constante, em meio LB líquido (Kasvi®), por 24 horas (30 °C). Foram então transferidas para meio Landylíquido sem ferro (1 L de água destilada, 20 g de glicose, 5 g de ácido L glutêmico, 0,5 g de MgSO₄ 7 H₂O, 0,5 g de KCl, 1 g de KH₂PO₄, 1000 µL de Solução de 0,0014g/L de MnSO₄ e 0,0016 g/L de CuSO₄ (pH =7). E após 48 horas, foram transferidas para microplacas de 98 poços onde em cada poço foi adicionado 100 µL solução indicadora de Cromo Azurol S (CAS) e 100 µL da bactéria crescida em meio sem ferro, em triplicata. Depois de meia hora, foi avaliada a cor da solução presente em cada poço. A produção de sideróforos pelas bactérias no método de microplacas foi constatada pela mudança de coloração da mistura de azul para marrom-avermelhado. O controle negativo se caracterizou pelo meio na ausência de bactérias, e o controle positivo utilizado foi a estirpe bacteriana LMC 44 a.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com 3 repetições, a modificação da cor do meio de azul para marrom-avermelhado indicou a capacidade das estirpes em produzir ou não sideróforos.

No caso do método O-CAS, as bactérias foram crescidas em meio LB líquido e depois de 24 horas as culturas foram transferidas para microtubos de 1,5 mL e centrifugadas a 14000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células que ficaram aderidas ao fundo dos microtubos foram ressuspensas com meio landy sem ferro e vortexadas para melhor homogeneização. Em seguida, 5 µL da suspensão foram incubados em placas de Petri com meio landy sólido (15 g/L de agar) à 30 °C por 48 horas. Passado este tempo, com as culturas já crescidas, 15 mL de meio CAS sólido foi adicionado sobre as culturas e as placas foram mantidas em ambiente de temperatura por 14 dias, e então avaliadas. A produção de sideróforos foi constatada com base na presença ou não de halo claro ao redor da colônia, sendo a presença de halo indicativo de resultado positivo para a síntese de enzimas pectinolíticas. A atividade enzimática foi determinada pelo método de Hankin e Anagnostakis (1975), através da relação entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia, consistindo no índice enzimático (IE). O índice enzimático foi calculado pela expressão: diâmetro médio do halo de hidrólise/diâmetro médio da colônia.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em triplicata e as médias submetidas à análise de variância (ANOVA) e, posteriormente, comparadas pelo teste de Scott-Knott no software Rstudio ($p<0,05$).

3.5 Caracterização das estirpes de *Bacillus*

3.5.1. Teste de Gram para diferenciação dos grupos bacterianos

A primeira etapa na caracterização dos grupos bacterianos foi o teste de coração de Gram. Com o auxílio de uma alça de platina, uma pequena quantidade de cultura fresca em placa foi coletada e transferida para uma gota de água estéril em uma lâmina microscópica. Após a porção da cultura ser adicionada na água foi realizada uma homogeneização com a alça e então espalhada na placa e fixada por meio de flambagem da parte inferior da lâmina na chama de bico de Bunsen. A partir disso, as lâminas foram submetidas as etapas de coloração de Gram, como detalhado por Rocha et al. (2017).

As lâminas com esfregaço foram cobertas com cristal violeta que agiu por um minuto e passado este tempo a placa foi lavada com água destilada. Em seguida foi aplicado lugol por um minuto, recobrindo todo o esfregaço, que também foi removido com água destilada. Posteriormente, as lâminas foram lavadas brevemente com o solvente etanol-acetona (1:1), e

seu excesso foi removido com água destilada. Por último as lâminas foram cobertas por safranina durante 30 segundos e novamente lavadas com água destilada, secas sob temperatura ambiente e estas então foram observadas no microscópio para visualização das bactérias e da coloração obtida pelo tratamento de gram. A cor roxa indica bactérias Gram positivas, enquanto a coloração vermelha é um indicativo para bactérias Gram negativas. Como controle Gram positivo foi usado, a bactéria FORT 16 do Laboratório de Genética e Bioquímica da Embrapa Agrobiologia.

3.5.2. Pasteurização

Para a execução desta etapa, 1,0 mL de culturas crescidas em meio LB líquido por 12 horas a 30º C foram transferidas para microtubos de 1,5 mL. Estes foram submetidos a temperatura de 80º C por 12 minutos e posteriormente transferidos para uma caixa com gelo por cinco minutos. Passado este tempo, um volume de 100 µL de cada tratamento bacteriano foi transferido para placas de Petri contendo meio LB e espalhados na placa por meio de alça de Drigalski. As placas foram então incubadas a 30º C, e crescidas por 12 horas. Em seguida, as características morfológicas foram analisadas e comparadas as específicas de *Bacillus* spp., como colônias brancas e/ou opacas, com bordas irregulares e as vezes aveludada como descrito por Nall e Logan (2009).

3.6. Teste de controle da murcha de fusarium do tomateiro em mudas, sob condições de casa-de-vegetação

O ensaio foi realizado em casa de vegetação do Departamento de Solos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro utilizando-se duas cultivares, Heinz 9553 e Clause HM 7885, dois isolados de *Fol* (FUS 2903 e FUS 04.1) e cinco estípes bacterianas (DEST 31, DEST 60, DEST 83 e DEST 132, incluindo o controle positivo FORT 02 do trabalho de Rocha et al. (2017)).

As sementes das cultivares de tomate foram semeadas em bandejas de polietileno sob o substrato Multiplant® para a obtenção das mudas até apresentarem de dois a três pares de folhas completamente expandidas. Ao atingir este estágio de desenvolvimento, as mudas foram removidas das células, lavadas para remoção de substrato aderido, as raízes foram podadas a cerca de 2,0 cm do ápice. Em seguida, foram acondicionadas em beckeres contendo suspensão das respectivas estípites bacterianas, com concentração ajustada para DO₆₀₀ (densidade ótica) = 0,6-0,7. As testemunhas, sem adição de bactéria, foram tratadas com água destilada estérilizada. Posteriormente, as mudas foram transplantadas para vasos de 8,0 L preenchidos com mistura de solo, areia, substrato (2,5:1,5:2,5), previamente inoculados.

A inoculação do substrato foi feita um dia antes do transplantio, com a adição de 200 mL de suspensão de esporos ($1,0 \times 10^7$ microconídios mL⁻¹) de cada um dos dois isolados de *Fol*, FUS 2903 e FUS 04-1. Nos vasos testemunha, sem fungo, foi adicionado 200 mL de água destilada autoclavada.

As avaliações foram feitas aos 30 dias após inoculação, quando foram anotados a incidência de plantas infectadas, a massa fresca da parte aérea, a altura das plantas (AH) e a extensão da necrose nos vasos (EN). Com base nestas duas últimas medidas, calculou-se a

porcentagem de infecção vascular (PIV%) pela relação (EN/AH) * 100 (CARVALHO et al., 2005). Determinou-se, ainda, a severidade da doença utilizando-se a escala de Santos (1997).

Utilizou-se o delineamento experimental de blocos casualizados, com cinco repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) no software Rstudio e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização inicial de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Os onze isolados de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, quando inoculados nas mudas de tomateiro, resultaram em reação compatível em pelo menos um das duas cultivares testadas com evolução de sintomas típicos de murcha-de-fusário. Os sintomas iniciais foram observados a partir de 12 dias após a inoculação tanto na cultivar Clause HM7885 como em Heinz 9553 e se caracterizaram pelo amarelecimento das folhas inferiores, mas rapidamente progrediram para murcha e morte das plantas, em casos mais severos (Figura 1).

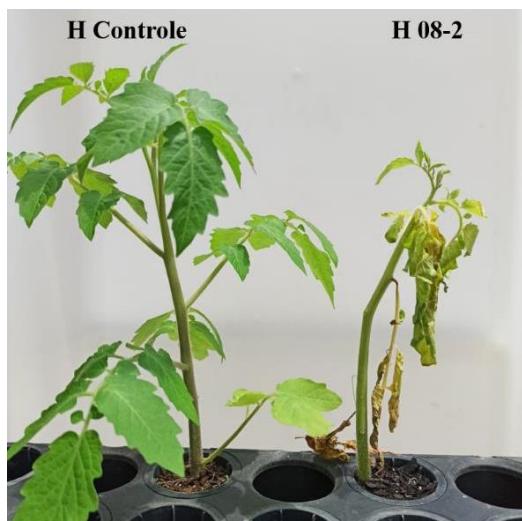


Figura1. Mudas saudáveis, não inoculada com patógeno (à esquerda), e mudas infectadas, inoculada com o isolado FUS 08.2 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (à direita), em teste utilizando a cultivar Heinz 9553.

Observou-se incidência de 100% de mudas infectadas na cultivar Clause HM7885 inoculadas com os isolados testados, exceto com FUS 05.2 (85%) e FUS 1405 (28%). O mesmo ocorreu com a cultivar Heinz 9553, exceto quando inoculadas com os isolados FUS 152/12 (85%) e FUS 3302 (57%) e FUS 1405 (0%). A severidade, medida com base na percentagem de extensão vascular necrosada variou de 34,1 a 97,9% em Clause HM7885 e de 0 a 100% em Heinz 9553 (Tabela 3). Para ambas as cultivares, menor incidência e severidade foi resultante de inoculações com o isolado FUS 1405, isolado mais antigo (CARVALHO et al., 2005). E, as duas cultivares apresentaram reação compatível com a classificação SU (Susceptível) a AS (altamente suscetível) à maioria dos isolados testados (REIS et al., 2004b), exceto aos isolados FUS 07.2, FUS 152/12, FUS 3302 e FUS 1405 (Tabela 3). Este resultado indica variação na virulência dos isolados, sendo essa sempre menor nos dois isolados mais antigos, preservados (FUS 1405 e FUS 3302). Esta menor virulência está relacionada, provavelmente à redução gradativa desta característica com o armazenamento, perceptível pela menor taxa de esporulação nos cultivos em placa. Por ser um dos isolados provenientes de uma coleção de 2014 pode ter ocorrido um acúmulo excessivo de produtos de excreção no meio de preservação, que são inerentes ao metabolismo fúngico e que podem ter resultado na perda de características originais da cultura (PIMENTEL et al., 1981).

Tabela 3. Porcentagem de infecção vascular (PIV%), incidência de plantas infectadas (I), severidade expressa em nota conforme escala de Santos (1997) de duas cultivares de tomateiro (Clause HM 7885 e Heinz 9553), inoculadas com 11 isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici*.

Clause HM7885				Heinz 9553			
Isolados	P.I.V. (%)	Incidência (%)	Nota	Isolados	P.I.V. (%)	Incidência (%)	Nota
FUS 04.1	97,94	100	4,57	FUS 08.2	100	100	4,57
FUS 2903	97,52	100	3,29	FUS 04.1	95,71	100	4,71
FUS 03.1	96,65	100	3,57	FUS 03.1	97,57	100	4,29
FUS 08.2	91,64	100	4,00	FUS 02.3	94,92	100	3,71
FUS 05.2	88,98	85	3,29	FUS 02.4	94,35	100	4,29
FUS 02.4	88,47	100	3,57	FUS 2903	88,62	100	3,43
FUS 02.3	84,46	100	3,57	FUS 05.2	81,51	100	2,83
FUS07.2	75,11	100	2,29	FUS 07.2	76,10	100	2,00
FUS 152/12	74,31	100	2,43	FUS 3302	53,56	85	2,00
FUS 3302	53,69	100	1,86	FUS 1405	13,45	57	1,29
FUS 1405	34,11	28	1,57	FUS152/12	0,00	0	1,00
Controle	0,00	0	1,00	Controle	0,00	0	1,00

Nota Escala de Reis et al. (2004b) (1,0= semelhante à imune (SI); 1,1-2,0= altamente resistente (AR); 2,1-3,0= medianamente resistente (MR); 3,1-4,0= suscetível (SU); 4,1-5,0= altamente suscetível (AS).

Para as duas cultivares, de forma geral, houve redução da altura e da massa fresca das plantas inoculadas com isolados mais virulentos (Tabela 4), com coeficientes de correlação (*r*) negativos e significativos (*p* <0,005) entre porcentagem de infecção vascular (PIV%) e acúmulo de massa fresca (Tabela 5).

Tabela 4. Altura das plantas (cm) de duas cultivares de tomateiro inoculadas com 11 isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Clause HM7885		Heinz 9553	
Isolados	Altura da Planta	Isolados	Altura da Planta
Controle	35,71 a	Controle	41,20 a
FUS 1405	33,96 a	FUS 152/2	39,37 a
FUS 07.2	30,80 b	FUS 1405	35,90 ab
FUS 3302	28,76 b	FUS 3302	30,04 bc
FUS 152/12	27,99 b	FUS 07.2	28,76 bc
FUS 05.3	23,81 c	FUS 05.2	27,41 cd
FUS 02.4	23,60 c	FUS 04.1	23,79 cd
FUS 08.2	23,46 c	FUS 2903	23,67 cd
FUS 03.1	22,93 c	FUS 02.3	22,00 cd
FUS 04.1	22,24 c	FUS 03.1	21,99 cd
FUS 02.3	21,70 c	FUS 02.4	21,76 cd
FUS 2903	20,86 c	FUS 08.2	19,60 d

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 5. Correlação entre massa fresca da parte aérea (MFPA) e porcentagem de infecção vascular (PIV%).

MFPA		PIV%	
		r	p
	ClauseHM7885	- 0,81	0,00***
	Heinz 9553	- 0,84	0,00***

Estes resultados decorrem da interferência no acúmulo de massa fresca pela planta em função de maiores taxas de infecção vascular levando à perda de água e murchamento das plantas devido à obstrução dos vasos e à toxicidade (LAKSHMINARAYANAN, 1953). O efeito deletério de *Fol* às plantas deve-se também às toxinas produzidas pelo patógeno em decorrência de danos causados à membrana das células que resulta em vazamento de água (WANG et al., 2014). De qualquer forma, ambas as teorias relacionam a doença ao desequilíbrio hídrico, que provavelmente é o responsável pelo menor aporte de massa fresca vegetal.

Com base no potencial de virulência, efeitos deletérios nas cultivares utilizadas e buscando-se representatividade de épocas e locais de isolamento diversificados, os isolados FUS 2903 e FUS 04-1 foram selecionados para o teste de controle biológico em casa de vegetação. Os resultados referentes a este teste serão apresentados posteriormente.

4.2 Seleção de estirpes de *Bacillus* eficientes na inibição de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* em ensaios *in vitro*

Das 50estirpes bacterianas confrontadas com quatro isolados de *Fol* (FUS 3302, FUS 2903, FUS 1405 e FUS 1302), oito foram capazes de inibir o crescimento micelial de pelo menos um dos isolados testados em no mínimo 50%, quando comparado ao controle, conforme fórmula proposta por Menten et al. (1976). Este critério, permitiu a seleção de oito estirpes bacterianas, DEST 30, DEST 31, DEST 38, DEST 60, DEST 78, DEST 83, DEST 132 e DEST 138 (Figura 2), que foram submetidas a um novo ensaio de estrias paralelas e testes funcionais para a seleção das mais promissoras para o controle biológico de murcha do fusário do tomateiro em casa de vegetação.

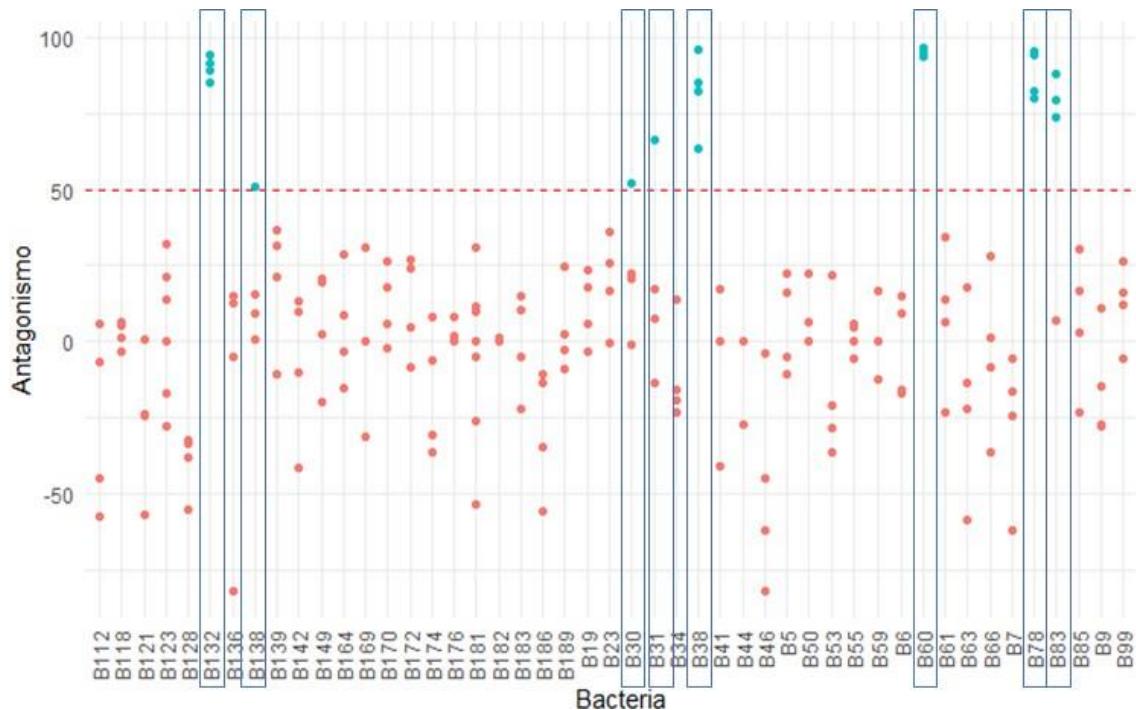


Figura 2. Inibição de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* por estirpes de *Bacillus* sp. A linha vermelha pontilhada indica pelo menos 50% de inibição, valor mínimo adotado na seleção dos organismos antagonistas, destacados de azul.

4.3 Inibição *in vitro* em testes usando o método de estrias paralelas

Com o objetivo de confirmar e dimensionar o potencial das oito estirpes de *Bacillus* pré-selecionadas em inibir o crescimento de *Fol* em testes *in vitro*, foram realizados dois testes utilizando o método de estrias paralelas em meio BDA (Figura 3) utilizando-se isolados do patógeno, FUS 3302, FUS 1405, FUS 2903 e FUS 04.1, e em meio LB (Figura 4), utilizando-se as três primeiras estirpes citadas.

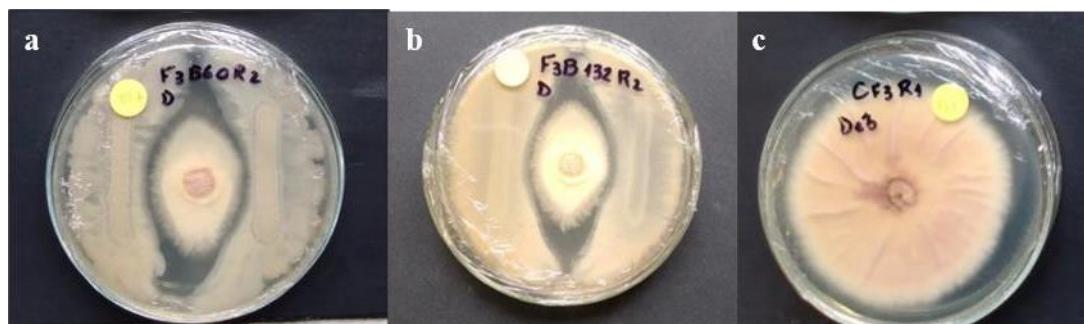


Figura 3. Crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, isolado FUS 1405, na presença das estirpes bacterianas DEST 60 (a), DEST 132 (b) e testemunha sem bactéria (c), em meio BDA.

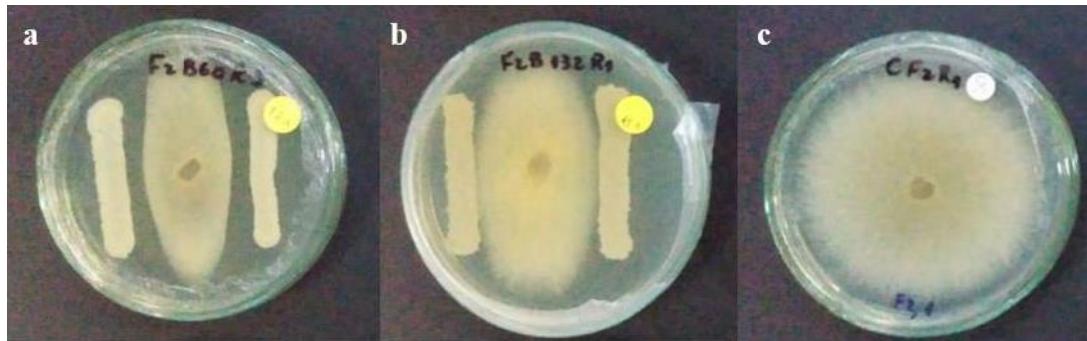


Figura 4. Crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, isolado FUS 3302, na presença das estirpes bacterianas DEST 60 (a), DEST 132 (b) e testemunha sem bactéria (c), em meio LB.

As oito estirpes bacterianas promoveram inibição relativa (IR%) de 61,97 a 92,78 % do crescimento do quatro isolados do patógeno em meio BDA. A única exceção foi para o confronto entre a estirpe DEST 30 e FUS 04-1 com inibição de 37,16%. (Tabela 6). Em LB, não padrão para este tipo de teste, a inibição relativa foi menor, em geral inferior a 50% para os fungos FUS 2903 e FUS 3302, exceto no confronto da bactéria DEST 60 para ambos com inibição de 53,87% e 51,90% respectivamente. A inibição do crescimento da área micelial do isolado fúngico FUS 1405 confrontadas com as estirpes bacterianas foi de pelo menos 50% em relação a área do controle, no entanto, para a estirpe DEST 30 a inibição foi de 47,92%. Para confirmar a inibição do crescimento fúngico quando confrontadas com as bactérias têm-se ainda a comparação das médias da área micelial dos tratamentos onde o fungo foi confrontado com as estirpes bacterianas com o controle sem bactéria, nos dois meios de cultura. De forma geral, a presença das bactérias reduziu significativamente o crescimento fúngico em relação ao controle, exceto no meio LB, onde o fungo FUS 3302 tratado com bactéria DEST 31 apresentou média de diâmetro de área micelial similar ao controle. Todas essas observações demonstram que estes resultados são compatíveis com os de outros autores que também relataram a redução do crescimento micelial de *Fol* por bactérias do gênero *Bacillus*. Jangir et al. (2018) selecionaram quatro estirpes em teste de antagonismo *in vitro* contra o agente causal da murcha de fusário de tomateiro. A estirpe FBZ24 de *Bacillus amyloliquefaciens* resultou em inibição do crescimento micelial de uma estirpe de *Fol* igual a 48,3% (ELANCHEZHIYAN, et al. 2018). Rocha et al. (2017) demonstraram a capacidade de estirpes FORT154 e FORT178 de *B. cereus* em reduzir o crescimento da estirpe FUS 152/12 de *Fol* em cerca de 50% em relação à testemunha.

Tabela 6. Resultado de teste em estrias paralelas, em meio BDA e LB, medido com base no crescimento micelial de quatro isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (mm^2) (FUS 2903, FUS 3302, FUS 1405, FUS 04.1), expresso pela área das colônias, e sua inibição relativa em relação à testemunha (%IR) por oito estirpes bacterianas previamente selecionadas.

Teste emmeio BDA											
FUS2903			FUS3302			FUS1405			FUS04.1		
Bactéria	Área (mm^2)	IR %	Bactéria	Área (mm^2)	IR %	Bactéria	Área (mm^2)	IR %	Bactéria	Área(mm^2)	IR %
Sem bact.	32,31 a	-	Sem bact.	36,06 a	-	Sem bact.	35,93 a	-	Sem bact.	52,76 a	-
DEST 30	9,16 b	73,43	DEST 31	12,42 b	66,86	DEST 30	13,81 b	71,12	DEST 30	29,38 b	37,16
DEST 38	8,53 b	74,82	DEST 30	11,33 bc	69,62	DEST 38	10,44 bc	78,26	DEST 78	17,78 c	61,97
DEST 60	8,45 bc	75,78	DEST 38	5,64 cd	85,11	DEST 31	10,03 bc	78,91	DEST 132	14,41 cd	69,18
DEST 78	8,04 bc	76,75	DEST 83	5,74 cd	84,58	DEST 83	9,20 bc	80,60	DEST 83	13,34 cd	71,47
DEST 31	7,8 bc	77,65	DEST 78	5,92 cd	83,88	DEST 60	9,03 bc	81,30	DEST 138	13,246 cd	71,67
DEST 83	6,52 bc	81,18	DEST 132	5,239 d	86,15	DEST 132	7,88 bc	83,33	DEST 60	12,30 cd	73,70
DEST 138	6,06 bc	82,54	DEST 138	5,03 d	86,06	DEST 78	7,27 c	84,47	DEST 38	8,55 de	81,73
DEST 132	2,48 c	92,78	DEST 60	4,07 d	89,23	DEST 138	6,98 c	85,56	DEST 31	4,24 e	76,69

Teste emmeio LB											
FUS2903			FUS3302			FUS1405			FUS04.1		
Bactéria	Área (mm^2)	IR %	Bactéria	Área (mm^2)	IR %	Bactéria	Área (mm^2)	IR %	Bactéria	Área(mm^2)	IR %
Sem bact.	52,29 a	-	Sem bact.	46,57 a	-	Sem bact.	45,20 a	-			
DLST 38	26,26 b	24,25	DEST 31	29,15 ab	19,98	DEST 30	24,83 b	47,92			
DEST 83	24,98 b	28,24	DEST 30	24,10 b	35,29	DEST 83	23,50 b	50,97			
DEST 78	23,97 b	31,24	DEST 38	23,31 b	37,64	DEST 31	23,22 b	51,63			
DEST 138	23,78 b	31,31	DEST 132	23,11 b	37,96	DEST 38	21,87 b	54,60			
DEST 31	23,56 b	32,41	DEST 78	23,01 b	38,62	DEST 78	20,75 b	56,81			
DEST 30	20,91 bc	39,49	DEST 138	20,99 b	43,84	DEST 138	20,39 b	57,38			
DEST 132	19,60 bc	43,28	DEST 83	19,40 b	47,92	DEST 132	19,50 b	59,38			

DEST 60	15,98 c	53,87	DEST 60	17,93 b	51,90	DEST 60	11,31 c	78,18
---------	---------	-------	----------------	---------	-------	----------------	---------	-------

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

4.4 Caracterização funcional das estirpes de *Bacillus* spp.

Para caracterizar os oito isolados pré-selecionados quanto às suas características funcionais, foram realizados uma série de testes: atividade celulolítica, proteolítica, produção de HCN, quitinases, pectinases e de sideróforos. Este conjunto de testes, permitiu detectar a síntese de enzimas e compostos associados ao processo de colonização do tecido vegetal e biocontrole dos fitopatógenos.

4.4.1 Atividade celulolítica

A capacidade das oito estirpes de *Bacillus* em produzir celulases foi testada utilizando-se o método de Kasana et al. (2008) e meio de cultura contendo carboximetilcelulose (CMC). Somente a estirpe DEST 30 (Tabela 7; Figura 5) não foi capaz de hidrolisar a carboximetilcelulose do meio de cultura, indicando um resultado negativo para a produção de celulase. As estirpes DEST 78 e DEST 83 embora estatisticamente inferiores às demais, também apresentaram resultado positivo para esta característica. As estirpes DEST 60, DEST 38, DEST 138, DEST 31 e DEST 132 foram as que apresentaram maior índice enzimático, equivalentes estatisticamente ao controle FORT 154 (ROCHA et al., 2017), o que indica uma maior atividade celulolítica (STAMFORD et al., 1998).

Tabela 7. Atividade celulolítica, proteolítica e pectinolítica de estirpes bacterianas medidas como base em índice enzimáticos (IE), determinado pela relação entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia.

Estirpe bacteriana	Índice Enzimático		
	Atividade celulolítica	Atividade proteolítica	Atividade pectinolítica
DEST 30	0,00 c	1,40 c	0 c
DEST 31	3,01 a	2,31 a	1,93 b
DEST 38	3,35 a	2,17 a	2,95 a
DEST 60	3,57 a	2,23 a	2,75 a
DEST 78	2,50 b	2,18 a	3,07 a
DEST 83	2,06 b	2,00 a	2,67 a
DEST 132	2,85 a	1,83 b	3,03 a
DEST 138	3,05 a	2,42 a	2,89 a
FORT 154	3,64 a	2,20 a	2,64 a
CV	12,19 %	10,56 %	8,88 %

Médias de três repetições; médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Scott-Knott.

A atividade celulolítica resulta da capacidade deste microrganismo em degradar celulose, que é uma característica essencial para um endofítico, por estar relacionada à habilidade deste em colonizar tecidos vegetais (ATALAY et al., 2015). Algumas estirpes de *Bacillus* como *B. pumilus* EB3 e FORT 154 foram capazes de degradar a celulose do meio CMC, como demonstrado por Ariffin et al. (2006) e Rocha et al. (2017), respectivamente.

No presente trabalho, a capacidade de degradar celulose foi confirmada em sete estirpes testadas, indicando uma característica favorável à colonização de tecido vegetal. Além disto, as enzimas celulolíticas podem estar envolvidas na atividade antagônica a oomicetos fitopatogênicos, incluindo *Pythium* e *Phytophtora*, uma vez que a parede celular destes organismos é composta por glucano e celulose (LIMA et al., 1998).

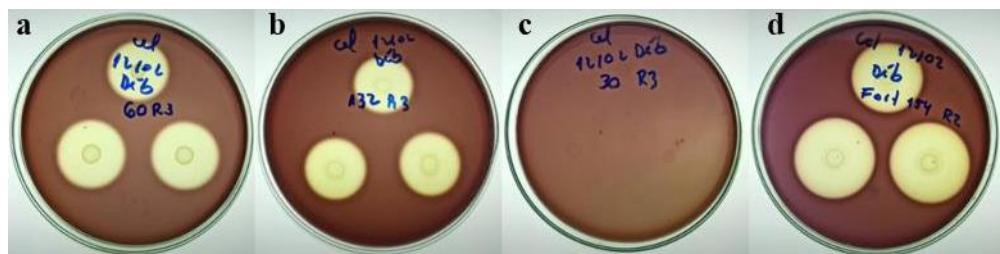


Figura 5. Atividade celulolítica dos isolados DEST 60 (a), DEST 132 (b), DEST 30 (c) e o controle positivo FORT154 (d) em meio CMC com detecção pelo método de iodine.

4.4.2. Atividade proteolítica

A produção de enzimas proteolíticas pelas estirpes bacterianas foi determinada pelo método de Saran et al. (2007). A presença de um halo claro ao redor das colônias após 48 horas de incubação indica a hidrólise da proteína do leite por proteases. Todas as oito estirpes bacterianas testadas (Tabela 7, Figura 6) apresentaram resultado positivo para a produção destas enzimas. Porém, as estirpes DEST 132 e DEST 30 foram as que apresentaram menor atividade proteolítica de acordo com o método empregado. As proteases são relatadas como enzimas úteis na atividade antagônica de agentes de biocontrole, já que catalisam a clivagem das ligações peptídicas em proteínas, danificando membranas da parede celular de fitopatógenos (TSENG et al., 2008). Além disso, essas enzimas também favorecem o processo de colonização das plantas hospedeiras pelos microrganismos endofíticos (JONES & DANGL, 2006). As proteases estão entre as exoenzimas mais produzidas por espécies de *Bacillus* (PRIEST, 1977). Estas enzimas proteolíticas foram associadas por Basurto-Cadena (2011) a antagonismo contra uma série de patógenos em testes *in vitro*. A produção destas enzimas pode estar envolvida com a capacidade das espécies bacterianas testadas neste trabalho em reduzir o crescimento micelial das estirpes de *Fol* nos testes *in vitro*. Rocha et al. (2017), ao selecionarem estirpes de *Bacillus* eficientes no controle de três raças de *Fol*, verificaram que a maior parte destas tinham como característica funcional a produção de proteases. No entanto, é difícil associar diretamente essas enzimas ao controle, pois diversos metabólitos produzidos por *Bacillus* possuem efeito antagônico contra outros microrganismos. Porém a produção de proteases configura-se como uma vantagem em um organismo antagonista por estar associado a degradação da membrana e

parede vegetal de fitopatógenos, e também por favorecer a colonização dos organismos benéficos no tecido hospedeiro (JONES & DANGL, 2006; TSENG et al., 2008).



Figura 6. Hidrólise da proteína do leite presente no meio por meio de enzimas proteolíticas produzidas pelas estirpes DEST 60 (a), DEST 132 (b), DEST 30 (c) e o controle positivo FORT 154 (d).

4.4.3. Produção de pectinase

Das oito estirpes de *Bacillus* testadas, sete foram capazes de produzir pectinases. E destas, a DEST 31 foi a que apresentou menor produção de halo enzimático quando comparada às demais (Tabela 7; Figura 7). A estirpe DEST 30 não apresentou atividade pectinolítica.

A atividade pectinolítica em bactérias do gênero *Bacillus* e *Paenibacillus* pode estar associada à sua capacidade endofítica (CHO et al., 2007; ZHAO et al., 2015). A capacidade de produzir moléculas que favoreçam a colonização dos tecidos vegetais, como as enzimas pectinolíticas, conferem aos organismos maior capacidade de penetração e de estabelecimento nos tecidos vegetais (VERMA et al., 2001). As pectinases são enzimas que degradam a pectina que é um dos constituintes da lamela média além de serem compostos constitutivos fundamentais da parede celular das células vegetais (ZHONGDONG et al., 2006).



Figura 7. Produção de enzima pectinase por bactérias DEST 60 (a), DEST 78 (b), DEST 138 (c) e o controle positivo *Bacillus subtilis* CR25 (d).

4.4.4. Produção de ácido cianídrico

Nenhuma das oito estirpes bacterianas testadas apresentou resultado positivo no teste para a produção de HCN. A produção de cianeto de hidrogênio (HCN) foi testada a partir do método descrito por Mariano e Souza (2016) (Figura 8). Esse composto tem sido relacionado a supressão de doenças de plantas, sobretudo daquelas causadas por fungos, por ser um composto altamente tóxico que atua a partir da inibição do citocromo c oxidase e várias outras metaloenzimas (BLUMER & HASS, 2000). Laville et al. (1998) associaram o ácido cianídrico como um dos importantes fatores no controle de *Thielaviopsis basicola* no tabaco por *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Embora a grande maioria das espécies bacterianas

relacionadas à produção de HCN sejam do gênero *Pseudomonas*, há estudos envolvendo bactérias dos gêneros *Rhizobium*, *Chromobacterium*, *Bacillus* e cianobactérias (BLUMER & HASS, 2000; LEE et al, 2007).

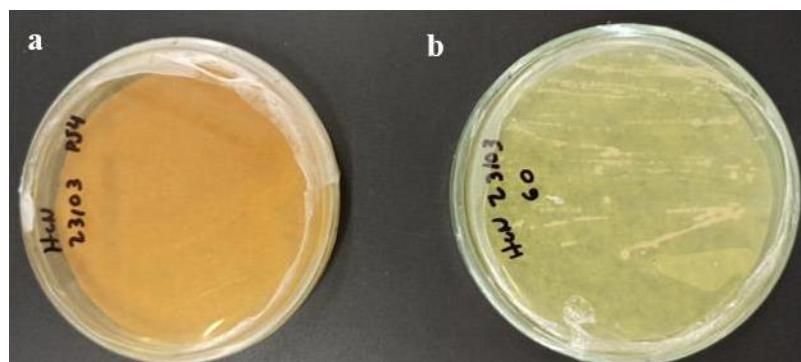


Figura 8. Detecção de produção de HCN por bactérias. A produção de HCN modifica a cor do papel filtro de amarelo para marrom-alaranjada. A esquerda o controle positivo *Pseudomonas protegens* PS4 (a), enquanto na direita, a estirpe DEST 60 (b) com resultado negativo

4.4.5. Atividade quitinolítica

Nenhuma das oito estirpes bacterianas testadas apresentou resultado positivo para a produção de quitinase, enzima lítica de interesse no controle biológico de fungos fitopatogênicos (Figura 9). É uma importante característica de biocontrole pois essas enzimas são capazes de degradar a quitina presente na parede celular de fungos e cutícula de insetos (MARTÍNEZ-ZAVALA et al., 2020). Morales de La Vega et al. (2006) demonstraram a atividade de quitinase purificada proveniente de uma estirpe de *Bacillus thuringiensis* na redução do crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos *Fusarium* sp. e *Sclerotium rolfsii*.



Figura 9. Produção de quitinase por bactérias. A presença do corante Calcofluor White M2R torna o meio fluorescente na presença de luz ultravioleta facilitando a visualização do halo e das colônias. Controlepositivo: *Paenibacillus illinoiensis* CB35 (j).

4.4.6. Produção de sideróforos

Todas as oito estirpes bacterianas analisadas produziram sideróforos de acordo com os métodos, microplaca de Arora e Verma (2017) (Figura 10) e O-CAS de Schwyn e Neilands (1987), adaptado por Pérez-Miranda et al. (2007) (Tabela 8, Figura 11).

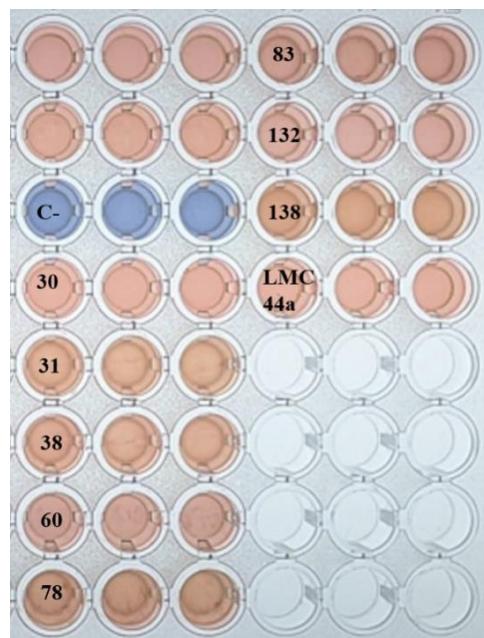


Figura 10. Produção de sideróforos pelas oito estirpes bacterianas testadas pelo método de microplaca (ARORA & VERMA, 2017). Controle: LMC 44a, a partir das identificações se encontram as triplicatas.

Tabela 8. Produção de sideróforos pelas estirpes bacterianas pelo método O-CAS (PÉREZ-MIRANDA et al., 2007).

Isolado	Índice enzimático – Produção de sideróforos
DEST 31	1,65 a
DEST 60	1,53 a
DEST 30	1,33 b
DEST 138	1,32 b
DEST 132	1,30 b
DEST 38	1,27 b
DEST 83	1,15 b
DEST 78	1,15 b
CV	12,19 %

Médias de três repetições. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Scott-Knott. Os valores dos índices enzimáticos (IE) representam a relação entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia.

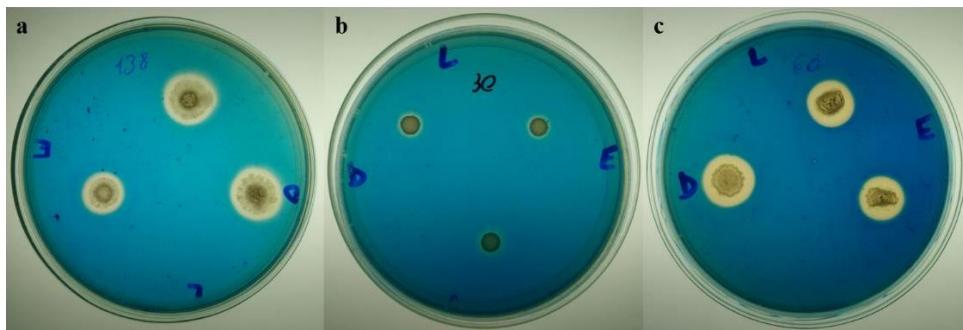


Figura 11. Produção de sideróforos pelas estirpes DEST 138 (a), DEST 30 (b) e DEST 60 (c) pelo método de O-CAS de Schwyn e Neilands (1987) adaptado por Pérez-Miranda et al. (2007).

A produção de sideróforos indica potencial da estirpe para o controle biológico e para a promoção de crescimento vegetal (KLOEPPE et al., 1980; YU et al., 2011). A síntese de sideróforos por organismos oferece uma grande vantagem competitiva aos organismos que os sintetiza, pois, estas moléculas peptídicas possuem alta afinidade por ferro. Muitos organismos habitantes da rizosfera possuem a habilidade de produzir diferentes tipos de sideróforos, porém os relacionados a uma maior afinidade por ferro são produzidos por rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPB) (KLOEPPE et al., 1980). Em uma condição de menor disponibilidade de ferro, os sideróforos quelam o ferro, formando um complexo sideróforo-ferro muito solúvel, que pode facilmente se ligar a receptores na membrana bacteriana ou de plantas, que conseguem então, acessar o ferro mais facilmente (SAHA et al, 2013). Por isso os sideróforos podem atuar tanto na supressão do crescimento de outros microrganismos através do favorecimento na competição pelo micronutriente com outros organismos habitantes da rizosfera, como aumentando a disponibilização deste elemento para a planta, e por isso, contribui indiretamente com o controle biológico e diretamente com a promoção de crescimento vegetal (KLOEPPE et al., 1980; JOSEPH et al, 2007; YU et al, 2011).

Na Tabela 9 é apresentado um resumo das características funcionais das estirpes de *Bacillus* testadas como potenciais antagonistas a *Fol*.

Tabela 9. Resultado sumarizado das características funcionais de estirpes de *Bacillus* previamente identificadas como promissoras no antagonismo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, onde + (atividade positiva); - (atividade inexistente), de acordo com os métodos utilizados.

Estirpe	Atividade				Produção		
	Proteolítica	Celulolítica	HCN	Quitinase	Pectinase	Sideróforos	
DEST 30	+	-	-	-	-	-	+
DEST 31	+	+	-	-	+	+	+
DEST 38	+	+	-	-	+	+	+
DEST 60	+	+	-	-	+	+	+
DEST 78	+	+	-	-	+	+	+
DEST 83	+	+	-	-	+	+	+
DEST 132	+	+	-	-	+	+	+
DEST 138	+	+	-	-	+	+	+

Os resultados obtidos a partir dos testes de caracterização funcional e estrias paralelas permitiram a seleção das estirpes DEST 31, DEST 60, DEST 83 e DEST 132 para serem testadas em ensaios em casa de vegetação utilizando-se plantas de tomateiro inoculadas com dois isolados de *Fol*, FUS 2903 e FUS 04.1, pré-selecionados no ensaio de patogenicidade.

4.5 Caracterização das estirpes selecionadas de *Bacillus* spp.

4.5.1 Teste de Gram e pasteurização

Embora o padrão descrito para bactérias benéficas do gênero *Bacillus* seja de bactérias Gram positivas ou Gram variável, todas as estirpes selecionadas que foram submetidas ao teste de Gram apresentaram coloração avermelhada (Figura 12), compatível com o padrão para bactérias Gram negativas (HARWOOD et al., 2013). Esse ocorrido também foi observado no trabalho de Rocha (2015) que também encontrou o mesmo resultado para algumas estirpes de *Bacillus* submetidas ao teste de Gram. Este ensaio foi repetido por três vezes em culturas puras e jovens, no entanto, em todas as vezes as culturas apresentaram coloração avermelhada (CAWOY et al., 2011). Sabe-se que a retenção do cristal violeta pelas células depende das propriedades físicas e químicas da parede celular, e caso estas sofram danos físicos ou químicos, estejam mortas ou velhas, podem não reter o primeiro corante, e por isso podem corar com a fucsina e indicar um falso gram-negativo (LEVY et al., 2001).

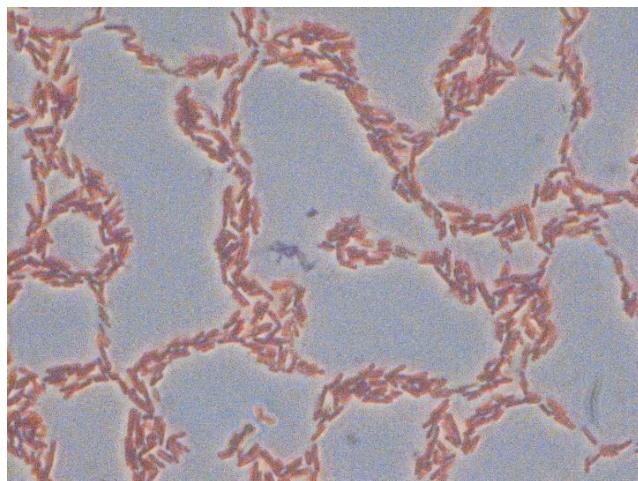


Figura 12. Estirpe bacteriana DEST 30 submetida ao teste de Gram.

Com isso, a pasteurização foi empregada para confirmar que se tratava de espécies de *Bacillus*, informação essencial para que a extração de DNA fosse realizada com eficiência. Após submetidas a pasteurização as oito bactérias cresceram (Figura 13), essa resposta em conjunto com as observações das características da colônia indicaram a identidade das estirpes como *Bacillus*, que esporulam quando sofrem um tratamento térmico (COLLINS, 1981).



Figura 13. Bactéria DEST 132 submetida à pasteurização e crescimento após diluição seriada (10^{-4}) e plaqueamento.

4.6 Testes em casa de vegetação com plantas das cultivares Heinz 9553 e Clause HM7885

As quatro estirpes de *Bacillus* spp. testadas não foram eficientes em reduzir a incidência da doença que foi de 100% para todos os tratamentos inoculados com os dois isolados do patógeno. Em avaliação feita aos 30 dias após a aplicação dos tratamentos e inoculação com os dois isolados do patógeno em teste (FUS 2903 e FUS 04.1), observaram-se plantas sintomáticas em todos os tratamentos inoculados, exceto a testemunha não inoculada. A maioria das estirpes bacterianas testadas não tiveram efeito na redução da severidade da doença nas cultivares Heinz 9553 e Clause HM 7885 no ensaio em vasos em condições de casa de vegetação. Registraram-se, ainda, porcentagem de infecção vascular maior que 19,65%. Também, de forma geral, não

se observou efeito significativo dos tratamentos na promoção de crescimento das plantas e acúmulo de massa fresca (Tabela 10, 11).

Tabela 10. Altura do caule, massa fresca da parte aérea e severidade da murcha de fusarium, expressa por Nota, e porcentagem de infecção vascular (PIV%), avaliados em plantas da cultivar **Heinz 9553** inoculadas com dois isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, FUS 2903 e FUS 04.1, e com estirpes de bactérias e tratamento testemunha.

FUS 2903					
Tratamento		Médias			
Patógeno	Estirpebacteriana	Altura do caule (cm)	Massa fresca parte aérea (g)	Nota	PIV %
Testemunha	Testemunha	51,8 a	25,05 a	1	0
FUS 2903	Testemunha	32,6 b	10,13 a	3,4	45,60
FUS 2903	FORT 02	31,2 b	14,02 a	2,0	54,08
FUS 2903	DEST 31	27,8 b	14,70 a	2,2	42,93
FUS 2903	DEST 60	25,3 b	15,31 a	2,4	35,14
FUS 2903	DEST 83	31,8 b	14,40 a	2,0	47,29
FUS 2903	DEST 132	40,7 ab	15,31 a	2,0	37,15
FUS 04-1					
Fungo	Bactéria	Altura do caule (cm)	Massa fresca parte aérea (g)	Nota	PIV (%)
Testemunha	Testemunha	66,0 a	25,05 a	1	0
FUS 04.1	Testemunha	35,9 b	9,89 b	3,5	67,24
FUS 04.1	FORT 02	40,02 ab	6,20 b	3,2	65,73
FUS 04.1	DEST 31	40,2 ab	8,50 b	3,4	64,50
FUS 04.1	DEST 60	36,9 b	10,93 b	3,0	68,90
FUS 04.1	DEST 83	27,2 b	9,80 b	3,2	72,94
FUS 04.1	DEST 132	40,7 ab	11,08 b	3,8	62,08

Médias de cinco repetições. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. Nota - Escala de Santos (1997) - (1) plantas sem sintomas; (2) plantassem sintomas de murcha ou amarelecimento, mas com escurecimento vascular; (3) plantas com escurecimento vascular e com murcha ou amarelecimento foliar; (4) plantas com murcha intensa, associada com amarelecimento e necrose foliar; (5) plantas mortas.

No ensaio realizado com a cultivar Heinz 9553, a intensidade da doença foi maior nas plantas inoculadas com o isolado FUS 04.1 que com FUS 2903, com notas maiores ou iguais a 3,0 e 2,0, respectivamente, e porcentagem de infecção vascular maiores ou iguais a 62,08% e 35,14%, respectivamente (Tabela 11). Não houve diferenças entre os tratamentos, entre si ou comparado à testemunha, quanto à redução da intensidade da doença causada pelo isolado FUS 04.1, com notas variando de 3,2 a 3,8 que indicam presença de necrose vascular acompanhada por sintomas externos como murcha e/ou amarelecimento foliar. No segundo isolado, FUS 2903, a intensidade da doença foi menor nas plantas tratadas com as estirpes em teste, nota variando de 2,0 a 2,4 que indicam plantas com necrose vascular, mas sem sintomas externos, enquanto no tratamento controle inoculado apenas com o fungo patogênico a nota média foi 3,4, ou seja

com necrose e presença de murchas e, ou, amarelecimento foliar. Com base neste resultado pode-se levantar a hipótese de que as estirpes bacterianas não impediram ou restringiram o processo de infecção e colonização dos vasos pelo fungo FUS 2903 (PIV% variando de 35 a 54%), mas reduziram os efeitos deletérios da infecção sobre os processos de absorção de água e nutrientes pelas plantas resultando em sintomas externos mais brandos. No caso dos tratamentos inoculados com o fungo FUS 04.1, não se observou o mesmo efeito, com notas maior ou igual a 3,0 em todos os tratamentos.

Os efeitos benéficos decorrentes dos tratamentos com as bactérias muitas vezes foram muito sutis, mas presentes. Na cultivar Heinz 9553, as mudas inoculadas com o isolado FUS 2903 e coinoculada com a estirpe DEST 132 apresentou altura significativamente similar ao controle, ao contrário das demais. O que também ocorreu nas mudas da cultivar Heinz 9553 inoculadas com o isolado FUS 04.1 e tratadas com as estirpes DEST 132, DEST 31 e FORT 02. Nestes tratamentos observou-se altura de plantas igual à das plantas testemunhas não tratadas, ou seja, não inoculada com o patógeno e não tratada com isolado de estirpes bacterianas em teste. Esses efeitos benéficos não foram vistos para a variável resposta massa fresca da parte aérea. A presença da bactéria não afetou o acúmulo de massa fresca para as plantas inoculadas com o fungo FUS 2903. Todas as plantas inoculadas com o isolado FUS 04.1, mesmo co-inoculadas com *Bacillus* apresentaram diferença significativa em relação ao controle, tendo menor massa fresca, o que talvez possa ser relacionada à infecção vascular promovida pelo patógeno.

Tabela 11. Altura da haste, massa fresca da parte aérea e severidade da murcha de fusarium, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, expressa por Nota e porcentagem de infecção vascular (PIV%), avaliados em plantas da cultivar **Clause HM7885** inoculadas com dois isolados do patógeno, FUS 2903 e FUS 04.1, e com seis estirpes da bactéria em teste e tratamento testemunha.

FUS 2903					
Tratamento		Médias			
Patógeno	Bactéria	Altura da haste (cm)	Massa fresca parte aérea (g)	Nota	PIV %
Testemunha	Testemunha	51,8 a	15,82 a	1	0
FUS 2903	Testemunha	35,5 a	7,80 b	2	69,75
FUS 2903	FORT 02	32,4 a	5,87 b	2,8	19,65
FUS 2903	DEST 31	35,1 a	7,99 b	3	35,73
FUS 2903	DEST 60	43,62 a	11,41 ab	3	56,63
FUS 2903	DEST 83	36,5 a	10,65 ab	2,8	26,23
FUS 2903	DEST 132	48,9 a	12,72 ab	1,4	26
FUS 04-1					
Fungo	Bactéria	Altura da haste (cm)	Massa fresca parte aérea (g)	Nota	PIV (%)
Testemunha	Testemunha	51,8 a	15,82 a	1	0
FUS 04.1	Testemunha	30,25 b	7,40 b	3	63,56
FUS 04.1	FORT 02	31,2 b	6,01 b	3	62,23
FUS 04.1	DEST 31	27,8 b	5,83 b	3,8	61,42
FUS 04.1	DEST 60	25,34 b	5,07 b	3,8	86,40
FUS 04.1	DEST 83	31,8 b	6,63 b	3,6	69,15

FUS 04.1	DEST 132	40,7 ab	10,99 ab	2,6	48,15
----------	----------	---------	----------	-----	-------

Médias de cinco repetições. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. Nota - Escala de Santos (1997) - (1) plantas sem sintomas; (2) plantas sem sintomas de murcha ou amarelecimento, mas com escurecimento vascular; (3) plantas com escurecimento vascular e com murcha ou amarelecimento foliar; (4) plantas com murcha intensa, associada com amarelecimento e necrose foliar; (5) plantas mortas.

Nas mudas do híbrido Clause HM 7885, a intensidade da doença foi maior nas plantas inoculadas com o isolado FUS 04.1, que resultou em notas na faixa de 2,6 a 3,8 enquanto para as mudas desta cultivar inoculadas com o isolado FUS 2903 as notas variaram de 1,4 a 3. Em se tratando da porcentagem de infecção vascular, esta foi superior a 19% nas plantas inoculadas com o isolado FUS 2903, e de forma geral, a infecção vascular das plantas co-inoculadas com as bactérias foi menor do que as plantas inoculadas somente com o patógeno. Por outro lado, as mudas inoculadas com o isolado FUS 04.1 apresentaram porcentagem de infecção vascular maior que 48%, e de forma geral, valores próximos ao observado nas plantas testemunhas inoculadas apenas com o patógeno.

Não houve efeito significativo dos tratamentos sobre a altura das hastes das plantas inoculados com FUS 2903. Já nas mudas inoculadas com o isolado FUS 04.1, as mudas inoculadas com o fungo fitopatogênico apresentaram altura do caule menor do que o tratamento inoculado apenas com água, a única exceção foi o tratamento inoculado com a bactéria DEST 132, que apresentou altura do caule significativamente semelhante ao controle sem o patógeno.

Em relação à massa fresca da parte aérea, no teste com o isolado FUS 2903, as plantas tratadas com as bactérias DEST 60, DEST 83 e DEST 132 foram estatisticamente semelhantes ao controle não inoculado como patógeno. A presença destas bactérias parece que, de alguma forma reduziram os efeitos deletérios da doença a partir de uma possível atuação na promoção de crescimento vegetal. Estas três bactérias apresentaram resultado positivo para produção de sideróforos, que é um composto útil na aquisição de ferro do ambiente (SAHA et al., 2013) contribuindo para o crescimento e acúmulo de biomassa. No entanto, outros mecanismos ou metabólitos não verificados neste estudo também podem estar envolvidos nessa resposta. Além

da produção de sideróforos há muitos outros metabólitos importantes na promoção de crescimento vegetal, como os lipopeptídeos e as auxinas, com destaque para o ácido indolacético (AIA). Além disso, as bactérias podem ter a capacidade de solubilizar fosfato e zinco, facilitando o aporte dos mesmos (OLANREWAJU et al., 2017).

Embora muitos trabalhos envolvendo a utilização de *Bacillus* sp. no controle da murcha de fusarium de tomateiro relatam resultados satisfatórios na supressão da doença (ABDALLAH et al., 2017; SHAHZAD et al., 2017; ROCHA et al., 2017; MEDEIROS & BETTIOL, 2021), no presente ensaio este mesmo resultado não foi observado.

Muitos trabalhos relatam a variabilidade na eficácia em que os organismos de biocontrole têm em suprimir doenças em diferentes condições, mesmo para os microorganismos aqui estudados. Embora estes tenham apresentado efeito antagônico significativo *in vitro*, não foram eficientes no controle da murcha de fusarium em tomates cultivados em casa de vegetação. Em condições naturais ocorrem complexas interações bióticas e abióticas que interferem e impactam diretamente no processo de biocontrole (YU et al., 2011; ZHANG et al., 2021). A inadequação do método de aplicação do bioagente ou concentração das suspensões bacterianas pode afetar a ação de biocontrole de doenças. No entanto, a concentração inicial das suspensões bacterianas não era conhecida, se baseando em densidade óptica, e é importante que este seja bem definida por influenciar no estabelecimento e colonização da rizosfera e tecido vegetal (YU et al., 2011). Além disso, a época de inoculação das estirpes bacterianas parece influenciar na eficiência do biocontrole. Zhang et al. (2021)

relatam a importância da inoculação dos agentes de biocontrole nas fases iniciais de crescimento vegetal para favorecer o controle de doenças por meio da proteção vegetal. Xu et al. (2010) ainda demonstraram redução na supressão de doenças foliares, quando os agentes de biocontrole, que atuam por meio de competição e indução de resistência, foram inoculados após o patógeno.

Embora, a maioria das bactérias testadas para o controle da murcha de fusarium do tomateiro em casa de vegetação não tenham apresentado resultados satisfatórios ou significativos no controle da doença, um discreto efeito na promoção de crescimento, acúmulo de massa e até mesmo redução da severidade foi observada em plantas inoculadas com algumas estirpes, sobretudo a DEST 132. Este resultado sugere a necessidade de realização de novos ensaios, porém com modificações metodológicas como época de inoculação das estirpes bacterianas, concentração e métodos a serem utilizados.

5 CONCLUSÕES

As duas cultivares de tomate industrial testadas, Heinz 9553 e Clause HM 7885, são suscetíveis à raça 3 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Os isolados de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* testados, FUS 04.1, FUS 08.2, FUS 03.1 e FUS 02.4, variam quanto à virulência ao tomateiro.

O ensaio de estrias paralelas permitiu selecionar estirpes de *Bacillus* com capacidade de reduzir o crescimento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* *in vitro* e de produzir sideróforos, proteases, celulases e pectinases.

As estirpes selecionadas não apresentaram atividade quitinolítica ou produção de HCN nos métodos testados.

As estirpes selecionadas e testadas não foram eficientes em controlar a murcha de fusariumdo tomateiro em testes em casa de vegetação.

As estirpes DEST 132, DEST 02 e DEST 31 apresentaram efeitos discretos, mas benéficos, quanto à promoção de crescimento de plantas de Heinz 9553 inoculadas com o patógeno, enquanto DEST 60, DEST 83 e DEST 132 promoveram efeito discreto em relação ao aumento de massa fresca em plantas de Clause HM7885 não inoculadas com o patógeno.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLAH, R. A. B.; STEDEL, C.; GARAGOUNIS, C.; NEFZI, A.; JABNOUN-HIAREDDINE, H.; PAPADOPPOULOU, K. K.; DAAMI-REMADI, M. Involvement of lipopeptide antibiotics and chitinase genes and induction of host defense in suppression of *Fusarium* wilt by endophytic *Bacillus* spp. in tomato. **Crop Protection**, v. 99, p. 45-58, 2017.
- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5th ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005.
- AGROFIT. Sistema de agrotóxicos fitossanitários do Ministério da Agricultura. 2022. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 20/02/2022.
- ALABOUVETTE, C.; LEMANCEAU, P.; STEINBERG, C. Recent advances in the biological control of *Fusarium* wilts. **Pesticide Science**, v. 37, n. 4, p. 365-373, 1993.
- ALABOUVETTE, C.; LEMANCEAU, P.; STEINBERG, C. Use of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and fluorescent pseudomonads to control *Fusarium* wilts. In: **International Workshop on Biological Control of Plant Diseases**. China Agricultural University Press, 1996.
- ALEXANDER, L. J.; TUCKER, C. M. Physiologic specialization in the tomato wilt. **Journal of Agricultural Research**, v. 70, p. 303, 1945.
- ALEXANDRE, A. R. D. S. **Bioprospecção de bactérias quitinolíticas e caracterização da atividade da enzima quitinase**. Dissertação (Genética e biologia molecular) – Universidade Federal de Goiás – Goiânia, 2018.
- ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G.; SARTÓRIO, R. C.; BINOTI, D. H.; SILVA, R. R.; LAU, D.; VANETTI, C. A. *Ralstonia solanacearum* em viveiros clonais de eucalipto no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 4, p. 357-366, 2006.
- AJILOGBA, C. F.; BABALOLA, O. O. Integrated management strategies for tomato *Fusarium* wilt. **Biocontrol science**, v. 18, n. 3, p. 117-127, 2013.
- AMINI, J.; SIDOVICH, D. The effects of fungicides on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* associated with *Fusarium* wilt of tomato. **Journal of plant protection research**, 2010.
- ARIFFIN, H.; ABDULLAH, N.; UMI KALSOM, M. S.; SHIRAI, Y.; HASSAN, M. A. Production and characterization of cellulase by *Bacillus pumilus* EB3. **Int. J. Eng. Technol.**, v. 3, n. 1, p. 47-53, 2006.
- ARNOLD, A. E.; LUTZONI, F. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? **Ecology**, v. 88, n. 3, p. 541-549, 2007.
- ARORA, N. K.; VERMA, M. Modified microplate method for rapid and efficient estimation of siderophore produced by bacteria. **3 Biotech**, v. 7, n. 6, p. 1-9, 2017.

ASHA, B. B.; NIRANJANA, S. R. ASHA, B. B. et al. Selection of effective bio-antagonistic bacteria for biological control of tomato wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **The bioscan**, v. 6, n. 2, p. 239-244, 2011.

ATALAY, M. A.; KOC, A. N.; DEMIR, G.; SAV, H. Investigation of possible virulence factors in *Candida* strains isolated from blood cultures. **Nigerian journal of clinical practice**, v. 18, n. 1, p. 52-55, 2015.

BARAKAT, R.M.; AL-MASRI, M.I. Enhanced Soil Solarization against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in the Uplands. **International Journal of Agronomy**, v. 2012, 2012.

BARBOZA, E. A.; CABRAL, C. S.; GONÇALVES, A. M.; REIS, A.; FONSECA, M. E. N.; BOITEUX, L. S. Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 infecting tomatoes in Northeast Brazil. **Plant Disease**, v. 97, n. 3, p. 422-422, 2013.

BASURTO-CADENA; M.G.L.; VAZQUEZ-ARTISTA, M.; GARCIA-JIMENEZ, J.; SALCEDO-HERNANDEZ, R.; BIDESHI, D.K.; BARBOZA-CORONA, J.E. Isolation of a new Mexican strain of *Bacillus subtilis* with antifungal and antibacterial activities. **The Scientific World Journal**, v. 2012, 2012.

BAWA, I. Management strategies of Fusarium wilt disease of tomato incited by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) A Review. **Int. J. Adv. Acad. Res**, v. 2, n. 5, 2016.

BECKMAN, C. H. **The nature of wilt diseases of plants**. APS press, 1987.

BENEDUZI, A.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L.M. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. **Genetics and molecular biology**, v. 35, n. 4, p. 1044-1051, 2012.

BIBI, N., ALI, S.; TABASSUM, R. Isolation and identification of novel indigenous bacterial strain as a low-cost pectinase source. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 61, 2018.

BIJU, V.C.; FOKKENS, L.; HOUTERMAN, P.M.; REP, M.; CORNELISSEN, B.J.C. Multiple evolutionary trajectories have led to the emergence of races in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Applied and environmental microbiology**, v. 83, n. 4, p. e02548-16, 2017.

BIZOS, G.; PAPATHEODOROU, E. M.; CHATZISTATHIS, T.; NTALLI, N.; ASCHONITIS, V. G.; MONOKROUSOS, N. The role of microbial inoculants on plant protection, growth stimulation, and crop productivity of the olive tree (*Olea europaea* L.). **Plants**, v. 9, n. 6, p. 743, 2020.

BLUMER, C.; HAAS, D. Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. **Archives of Microbiology**, v. 173, n. 3, p. 170-177, 2000.

BORRERO, C.; TRILLAS, M. I.; ORDOVÁS, J.; TELLO, J. C.; AVILÉS, M. Predictive factors for the suppression of Fusarium wilt of tomato in plant growth media. **Phytopathology**, v. 94, n. 10, p. 1094-1101, 2004.

CAMARGO, A. M. M. P.; CAMARGO, F. P.; ALVES, H. S.; CAMARGO-FILHO, W. P. Desenvolvimento do sistema agroindustrial do tomate. **Informações Econômicas**. São Paulo, v. 36, n. 6, p. 53-95, 2006.

CARRER FILHO, R. C.; DIANESE E. C.; CUNHA, M. G. Supressão da murcha de fusário em tomateiro por rizobactérias do gênero *Bacillus*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 45, p. 356-363, 2015.

CARVALHO, A. O.; JACOB NETO, J.; CARMO, M. G. F. Colonização de raízes de tomateiro por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* em solução nutritiva com três fontes de nitrogênio. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 1, p. 26-32, 2005.

CAWOY, H.; BETTIOL, W.; FICKERS, P.; ONGENA, M. *Bacillus*-based biological control of plant diseases. **Pesticides in the modern world-pesticides use and management**, p. 273-302, 2011.

CHO, K.M.; HONG, S.Y.; LEE, S.M.; KIM, Y.H.; KAHNG, G.G.; LIM, Y.P.; YUN, H.D. Endophytic bacterial communities in ginseng and their antifungal activity against pathogens. **Microbial Ecology**, v. 54, n. 2, p. 341-351, 2007.

COLLINS, E. B. (1981). Heat resistant psychrotrophic microorganisms. **Journal of Dairy Science**, v. 64, n. 1, p. 157-160, 1981.

CONSUEGRA, O. G.; MORALES, A. C.; LATERRROT, H. E.; ANAIS, G. B. J. Mejora genética y manejo del cultivo del tomate para la producción en el Caribe. **Instituto de Investigaciones Hortícolas "Liliana Dimitrova". La Habana**, 150 p., 2000.

CORRELL, J. C. The relationship between formaespeciales, races, and vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum*. **Phytopathology**, v. 81, n. 9, p. 1061-1064, 1991.

CROSA, J.H.; WALSH, C.T. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 66, n. 2, p. 223-249, 2002.

DA SILVA, J. B. C.; BRITTO GIORDANO, L. **Tomate para processamento industrial**. Embrapa, 2000.

DE CAL, A.; PASCUAL, S.; MELGAREJO, P. Involvement of resistance induction by *Penicillium oxalicum* in the biocontrol of tomato wilt. **Plant Pathology**, v. 46, n. 1, p. 72-79, 1997.

DE CANDOLLE, A. **Origin of Cultivated Plants**, 2 Ed, International Scientific Series. 1886.

DUIJFF, B.; POUHAIR, D.; OLIVIAN, C.; ALABOUVETTE, C.; LEMANCEAU, P. Implication of systemic induced resistance in the suppression of fusarium wilt of tomato by *Pseudomonas fluorescens* WCS417r and by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. **European Journal of Plant Pathology**, v. 104, n. 9, p. 903-910, 1998.

ELANCHEZHIYAN, K.; KEERTHANA, U.; NAGENDRAN, K.; PRABHUKARTHIKEYAN, S. R.; PRABAKAR, K.; RAGUCHANDER, T.; KARTHIKEYAN, G. Multifaceted benefits of *Bacillus amyloliquefaciens* strain FBZ24 in the management of wilt disease in tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 103, p. 92-101, 2018.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2003.

FLOR, H.H. The complementary genic systems in flax and flax rust. **Advances in genetics**, v. 8, p. 29-54, 1956.

FRY, W. E. Principles of plant disease management. New York: **Academic Press**, 1982.

FUCHS, J. G.; MOENNE-LOCCOZ, Y.; DE'FAGO, G. Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 induces resistance to Fusarium wilt in tomato. **Plant Disease**, v. 81, n. 5, p. 492-496, 1997.

GERSZBERG, A.; HNATUSZKO-KONKA, K.; KOWALCZYK, T.; KONONOWICZ, A. K. Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in the service of biotechnology. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 120, n. 3, p. 881-902, 2015.

GONÇALVES, A. D. M.; AGUIAR, F. M.; LOPES, C. A.; FONSECA, M. E. D. N.; BOITEUX, L. S.; COSTA, H.; REIS, A. Primeiro registro de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3 no Estado de Minas Gerais. **Congresso Brasileiro de Fitopatologia**, 46.; Reunião Brasileira de Controle Biológico, 11., 2013, Anais. Ouro Preto: UFV, 2013.

GONÇALVES, A. M.; CABRAL, C. S.; REIS, A.; FONSECA, M. E. N.; COSTA, H.; RIBEIRO, F. H. S.; BOITEUX, L. S. A three-decade survey of Brazilian *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races assessed by pathogenicity tests on differential tomato accessions and by molecular markers. **Journal of Applied Microbiology**, v. 131, n. 2, p. 873-884, 2021.

GONZALEZ-CENDALES, Y.; CATANZARITI, A. M.; BAKER, B.; MCGRATH, D. J.; JONES, D. A. Identification of I-7 expands the repertoire of genes for resistance to Fusarium wilt in tomato to three resistance gene classes. **Molecular Plant Pathology**, v. 17, n. 3, p. 448-463, 2016.

GOSME, M.; LUCAS, P. Disease spread across multiple scales in a spatial hierarchy: effect of host spatial structure and of inoculum quantity and distribution. **Phytopathology**, v. 99, n. 7, p. 833-839, 2009.

HANKIN, L., ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, v. 67, n. 3, p. 597-607, 1975.

HARWOOD, C.R.; POHL, S.; SMITH, W.; WIPAT, A. *Bacillus subtilis*: model Gram-positive synthetic biology chassis. In: **Methods in microbiology**. Academic Press. p. 87-117, 2013.

IOANNOU, N. Soil solarization as a substitute for methyl bromide fumigation in greenhouse tomato production in Cyprus. **Phytoparasitica**, v. 28, n. 3, p. 248-256, 2000

JANGIR, M.; PATHAK, R.; SHARMA, S.; Shilpi SHARMA, S. Biocontrol mechanisms of *Bacillus* sp., isolated from tomato rhizosphere, against *Fusarium oxysporum* f. sp.*lycopersici*. **Biological Control**, v. 123, p. 60-70, 2018.

JI, H. M.; ZHAO, M.; GAO, Y.; CAO, X. X.; MAO, H. Y.; ZHOU, Y.; LIU, P. FRG3, a target of slmiR482e-3p, provides resistance against the fungal pathogen *Fusarium oxysporum* in tomato. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 26, 2018.

JONES, J. D.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 323-329, 2006.

JONES, J.P.; WOLTZ, S.S. Field control of fusarium wilt (race 2) of tomato by liming and stake disinfection. In: **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, v. 81, 1968.

JOSEPH, B.; PATRA, R. R.; LAWRENCE, R. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). **International Journal of Plant Production**, v. 1, n. 2, p. 141-152, 2007.

JOSH, R. A review of *Fusarium oxysporum* on its plant interaction and industrial use. **J. Med. Plants Stud**, v. 6, n. 3, p. 112-115, 2018.

KASANA, R. C.; SALWAN, R.; DHAR, H.; DUTT, S.; GULATI, A. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. **Current microbiology**, v. 57, n. 5, p. 503-507, 2008.

KAUL, M. L. H. Reproductive biology in tomato. **Genetic improvement of tomato**. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 39-50, 1991.

KHAN A.L.; HUSSAIN J.; AL-HARRASI, A.; AL-RAWAHI, A.; LEE, I.J. Endophytic fungi: resource for gibberellins and crop abiotic stress resistance. **Critical reviews in biotechnology**, v. 35, n. 1, p. 62-74, 2015.

KLOEPFER, J. W.; LEONG, J.; TEINTZE, M.; SCHROTH, M. N. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. **Nature**, v. 286, n. 5776, p. 885-886, 1980.

KLOEPFER, J. W.; RYU, C. M.; ZHANG, S. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. **Phytopathology**, v. 94, n. 11, p. 1259-1266, 2004.

KUROZAWA, C; PAVAN, M.A. Doenças do tomateiro. **Manual de Fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 607-626, 2005.

LAKSHMINARAYANAN, K. Mechanism of fusarium wilts of plants. **Proceedings of the Indian Academy of Sciences-Section B**. Springer India, p. 161-164, 1953.

LANNA FILHO, R.; FERRO, H. M.; PINHO, R. S. C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 4, n. 2, p. 12-20, 2010.

LARKIN, R.P.; FRAVEL, D.R. Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of Fusarium wilt of tomato. **Plant disease**, v. 82, n. 9, p. 1022-1028, 1998.

LAVILLE, J.; BLUMER, C.; VON SCHROETTER, C.; GAIA, V.; DÉFAGO, G.; KEEL, C.; HAAS, D. Characterization of the hcnABC gene cluster encoding hydrogen cyanide synthase and anaerobic regulation by ANR in the strictly aerobic biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. **Journal of bacteriology**, v. 180, n. 12, p. 3187-3196, 1998.

LEE, K. J.; KAMALA-KANNAN, S.; SUB, H. S.; SEONG, C. K.; LEE, G. W. Biological control of *Phytophthora* blight in red pepper (*Capsicum annuum* L.) using *Bacillus subtilis*. **World journal of microbiology and biotechnology**, v. 24, n. 7, p. 1139-1145, 2008.

LEMANCEAU, P.; BAKKER, P. A. H. M.; de KOGEL, W. J.; ALABOUVETTE, C.; SCHIPPERS, B. Antagonistic effect of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 and pseudobactin 358 upon pathogenic *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 1, p. 74-82, 1993.

LEVY, C. E.; ZOCCOLI, C. M.; MAMIZUKA, E. M.; ROSSI, F.; MESIANO, E. R. A. B.; MARIA, G. Manual de procedimentos básicos em microbiologia clínica para o controle de infecção hospitalar: módulo 1. **Manual de procedimentos básicos em microbiologia clínica para o controle de infecção hospitalar: módulo 1.** (pp. 51-51), 2001.

LIMA, L.H.C.; MARCO, J.L.; FELIX, J.R. 1998. Enzimas hidrolíticas envolvidas no controle biológico por microparasitismo. **Controle biológico**, v. 11, p. 263-304, 1998.

LOPES, C. A.; REIS, A.; ÁVILA, C. Principais doenças do tomate para mesa causadas por fungos, bactérias e vírus. **Informe Agropecuário**, v. 24, n. 219, p. 66-78, 2003.

LOPES, A. C.; MARQUELLI, W. A.; CAFÉ FILHO, A. C. Associação da irrigação com doenças de hortaliças. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 14, p. 151-179, 2006

MA, L. J.; GEISER, D. M.; PROCTOR, R. H.; ROONEY, A. P.; O'DONNELL, K.; TRAIL, F.; KAZAN, K. *Fusarium* pathogenomics. **Annual review of microbiology**, v. 67, p. 399-416, 2013.

MARIANO, R. L. R.; SOUZA, E. B. **Manual de práticas em fitobacteriologia**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, v. 413, 2016.

MARTÍNEZ-ZAVALA, S. A.; BARBOZA-PÉREZ, U. E.; HERNÁNDEZ-GUZMÁN, G.; BIDESHI, D. K.; BARBOZA-CORONA, J. E. Chitinases of *Bacillus thuringiensis*: Phylogeny, modular structure, and Applied potentials. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 3032, 2020.

MCGOVERN, R.J. Management of tomato diseases caused by *Fusarium oxysporum*. **Crop Protection**, v. 73, p. 78-92, 2015.

MEDEIROS, C. A.; BETTIOL, W. Multifaceted intervention of *Bacillus* spp. against salinity stress and *Fusarium* wilt in tomato. **Journal of Applied Microbiology**, v. 131, n. 5, p. 2387-2401, 2021.

MENTEN, J. O. M. et al. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial da *Macrophomina phaseolina* *in vitro*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 1, p. 57-66, 1976.

MICHEREFF, S.J. Fundamentos de Fitopatologia. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2001.

MICHEREFF, S.J.; ANDRADE, D. E.G.T.; MENEZES, M. **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 2005.

MIZUBUTI, E. S. G.; MAFFIA, L. A. **Introdução à Fitopatologia**. Caderno didático 115. Editora UFV, 5.ed, Viçosa-MG, 2013.

MONTEALEGRE, J. P; SILVA, M; DÍAZ, V. Efecto de lasolarizacion y fumigacion em el control de *Fusarium oxysporum* y de malezas, ensuelos de invernaderosfríosmonocultivadoscon tomates. **Agro Sur**, v. 25, n. 1, p. 1-15, 1997.

MORALES DE LA VEGA, L.; BARBOZA-CORONA, J. E.; AGUILAR-USCANGA, M. G.; RAMÍREZ-LEPE, M. Purification and characterization of an exochitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* and its action against phytopathogenic fungi. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 7, 2006.

NAIKA, S.; JEUDE, J. V. L.; GOFFAU, M.; HILMI, H.; VAN DAM, B. **A cultura do tomate: produção, processamento e comercialização**. Agrodok 17. Wageningen, Fundação Agromisa e CTA, 2006.

NALL, A.; LOGAN, P. V. Genus I. *Bacillus* Cohn 1872, 174AL. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, v. 3, p. 21-127, 2009.

NIRMALADEVI, D.; VENKATARAMANA, M.; SRIVASTAVA, R. K.; UPPALAPATI, S. R.; GUPTA, V. K.; YLI-MATTILA T.; CHANDRA, N. S. Molecular phylogeny, pathogenicity and toxigenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-14, 2016.

NOGUEZ, M.A.; TOKESHI, H. Revisão da classificação da raça 3 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, v. 31, p. 419-430, 1974.

OLANREWAJU, O. S.; GLICK, B. R.; BABALOLA, O. O. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 11, p. 1-16, 2017.

OLIVEIRA, C. M.; DO CARMO, M. G. F.; FERREIRA, L. M.; HÖFTE, M., & DO AMARAL SOBRINHO, N. M. B. Race identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* isolates obtained from tomato plants in Nova Friburgo, Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 161, n. 2, p. 273-287, 2021.

ONGENA, M.; JACQUES, P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in microbiology**, v. 16, n. 3, p. 115-125, 2008.

ONGENA, M.; JOURDAN, E.; ADAM, A.; PAQUOT, M.; BRANS, A.; JORIS, B. et al. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. **Environmental microbiology**, v. 9, n. 4, p. 1084-1090, 2007.

ORSI, B. Tomate indústria: Brasil entre os 10 maiores produtores. **Anuário HF 2022**. Uberlândia-MG, 2022.

PALTI, J. Cultural practices and infections crop diseases. Berlin: Springer-Verlag, 1981.

PATEL, S.; SARAF, M. Biocontrol efficacy of *Trichoderma asperellum* MSST against tomato wilting by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 50, n. 5-6, p. 228-238, 2017.

PERALTA, I.E.; KNAPP, S.; SPOONER, D.M. Nomenclature for wild and cultivated tomatoes. **Tomato Genetics Cooperative Report**, v. 56, p. 6-12, 2006.

PEREIRA, R. B.; PINHEIRO, J. B. Murcha-de-fusário em tomateiro. **Embrapa Hortaliças-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2014.

PÉREZ-MIRANDA, S.; CABIROL, N.; GEORGE-TÉLLEZ, R.; ZAMUDIO-RIVERA, L. S.; FERNÁNDEZ, F. J. O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. **Journal of microbiological methods**, v. 70, n. 1, p. 127-131, 2007.

PIMENTEL, P.V.C.; FEITOSA, M.I.; CHIBA, S. Contribuição ao estudo da viabilidade e variabilidade de alguns isolados de *Phytophthora* do cacau (*Theobromacacao* L.). **Biológico (Brasil)** v. 47 (6) p. 159-168, 1981.

PRABHUKARTHIKEYAN, R.; SARAVANAKUMAR, D.; RAGUCHANDER, T. Combination of endophytic *Bacillus* and *Beauveria* for the management of Fusarium wilt and fruit borer in tomato. **Pest management science**, v. 70, n. 11, p. 1742-1750, 2014.

PRIEST, F. G. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. **Bacteriological reviews**, v. 41, n. 3, p. 711-753, 1977.

REIFSCHEIDER, F. J. B.; NASS, L. L.; HENZ, G. P.; HEINRICH, A. G.; RIBEIRO, C. S.; EUCLIDES FILHO, K.; QUECINI, V. **Uma pitada de biodiversidade na mesa dos brasileiros**. Francisco Reifschneider, Luciano Nass, Gilmar Henz, 2015.

REIS, A; BOITEUX L.S.; GIORDANO, L. B.; COSTA H.; LOPES, C. A. Ocorrência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3 em tomate no Brasil e seleção de novas fontes de resistência ao patógeno. **Embrapa Hortaliças-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 2004a.

REIS, A.; GIORDANO, L. D. B.; LOPES, C. A.; BOITEUX, L. S. Novel sources of multiple resistance to three races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in *Lycopersicon* germplasm. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 4, n. 4, 2004b.

REIS A; COSTA H; BOITEUX LS; LOPES CA. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 on tomato in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 426-428, 2005.

REIS, A.; BOITEUX, L. S. Outbreak of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 in commercial fresh-market tomato fields in Rio de Janeiro State, Brazil. **Horticultura Brasileira**, v. 25, p. 451-454, 2007.

REIS, A.; LOPES, C. A. Principais fungos de solo em Hortaliças: Epidemiologia e manejo. **Manejo integrado de doenças e pragas: Hortaliças.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, p. 189-224, 2007.

ROCHA, F.Y.O. Seleção e Caracterização Polifásica de Bactérias do Gênero *Bacillus* com Atividade Antagônica as Raças 1, 2 e 3 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Dissertação (Fitotecnia). Seropédica, UFRRJ, 2015.

ROCHA, F.Y.O.; de OLIVEIRA, C.M.; da SILVA, P.R.A.; de MELO, L.H.V.; do CARMO, M.G.F.; BALDANI, J.I. Taxonomical and functional characterization of *Bacillus* strains isolated from tomato plants and their biocontrole activity Against races 1, 2 and 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Applied Soil Ecology**, v.120, p.8-19, 2017.

ROMERO, D.; DE VICENTE, A.; RAKOTOALY, R.H.; DUFOUR, S.E.; VEENING, J.-W.; ARREBOLA, E.; CAZORLA, F.M.; KUIPERS, O.P.; PAQUOT, M.; PÉREZ-GARCÍA, A. The iturin and fengycin families of lipopeptides are keyfactors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v.20, n.4, 2007.

SAHA, R.; SAHA, N.; DONOFRIO, R. S.; BESTERVELT, L. L. Microbial siderophores: a mini review. **Journal of basic microbiology**, v. 53, n. 4, p. 303-317, 2013.

SAIN, M.; REP, M. The role of pathogen-secreted proteins in fungal vascular wilt diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 10, p. 23970-23993, 2015.

SANTOS, J. R. M. Methodology for screening tomato for Fusarium wilt, *Verticillium* wilt, gray leaf spot, early blight, and Septoria leaf spot. In: **Proceedings of the first international conference on the processing tomato and first international symposium on tropical tomato diseases.** ASHS Press, 1997.

SANTOS, A. S.; CARMO, M. G. F.; PEREIRA, L. F. Tomate de mesa a realidade nacional. Campo e Negócios. **Anuário HF 2022**. Uberlândia-MG, 2022.

SARAN, S.; ISAR, J.; SAXENA, R.K. A modified method for the detection of microbial proteases on agar plates using tannic acid. **Journal of biochemical and biophysical methods**, v. 70, n. 4, p. 697-699, 2007.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J.B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical biochemistry**, v. 160, n. 1, p. 47-56, 1987.

SHAHZAD et al; KHAN, A. L.; BILAL, S.; ASAFAF, S.; LEE, I. J. Plant growth-promoting endophytic bacteria versus pathogenic infections: an example of *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato. **Peer J**, v. 5, p. e3107, 2017.

SILVA, J.; BETTIOL, W. Potential of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* isolates for control of Fusarium wilt of tomato. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 409-412, 2005.

SRINIVAS, C.; DEVI, D. N.; MURTHY, K. N.; MOHAN, C. D.; LAKSHMEESHA, T. R.; SINGH, B.; SRIVASTAVA, R. K. (2019). *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* causal agent of vascular wilt disease of tomato: Biology to diversity - A review. **Saudi journal of biological sciences**, v. 26, n. 7, p. 1315-1324, 2019.

STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Enzymatic activity of microorganisms isolated from yam bean legume (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Food Science and Technology**, v. 18, p. 382-385, 1998.

SUNDARAMOORTHY, S.; BALABASKAR, P. Biocontrol efficacy of *Trichoderma* spp. against wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Journal of Applied Biology and Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 0-4, 2013.

TREICHEL, M. **ANUÁRIO BRASILEIRO DO TOMATE - 2016**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta. Santa Cruz, 2016.

TSENG, S. C.; LIU, S. Y.; YANG, H. H.; LO, C. T.; PENG, K. C. Proteomic study of biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* ETS 323 in response to *Rhizoctonia solani*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 16, p. 6914-6922, 2008.

VAN DER PLANK, J. E. **Plant diseases: epidemics and control**. Elsevier, 1963.

VÁSQUEZ-RAMÍREZ, L. M.; CASTAÑO-ZAPATA, J. Manejo integrado de lamarchitez vascular del tomate [*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) WC Snyder & HN Hansen]: una revisión. **Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica**, v. 20, n. 2, p. 363-374, 2017.

VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of biotechnology**, v. 91, n. 2-3, p. 127-141, 2001.

WANG, M.; LING, N.; DONG, X.; LIU, X.; SHEN, Q.; GUO, S. Effect of fusaric acid on the leaf physiology of cucumber seedlings. **European journal of plant pathology**, v. 138, n. 1, p. 103-112, 2014.

WESTSTEIJN, G. Soil sterilization and glasshouse disinfection to control *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici* in tomatoes in the Netherlands. **Netherlands journal of plant pathology**, v. 79, n. 1, p. 36-40, 1973.

XU, X. M.; SALAMA, N.; JEFFRIES, P.; JEGER, M. J. Numerical studies of biocontrol efficacies of foliar plant pathogens in relation to the characteristics of a biocontrol agent. **Phytopathology**, v. 100, n. 8, p. 814-821, 2010.

YU, X.; AI, C.; XIN, L.; ZHOU, G. The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on Fusarium wilt and promotes the growth of pepper. **European Journal of Soil Biology**, v. 47, n. 2, p. 138-145, 2011.

ZAMBOLIM, L.; VENTURA, J. A. Resistência a doenças induzida pela nutrição mineral das plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 1, p. 275-318, 1993.

ZHANG, Z.; LI, J.; ZHANG, Z.; LIU, Y.; WEI, Y. Tomato endophytic bacteria composition and mechanism of suppressiveness of wilt disease (*Fusarium oxysporum*). **Frontiers in microbiology**, p. 3016, 2021.

ZHAO, L.; XU, Y.; LAI, X; H.; SHAN, C.; DENG, Z; JI, Y. Screening and characterization of endophytic *Bacillus* and *Paenibacillus* strains from medicinal plant *Lonicera japonica* for use as potential plant growth promoters. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 977-989, 2015.

ZHONGDONG, L.; GUOHUA, W.; YUNCHANG, G.; KENNEDY, J. F. Image study of pectin extraction from orange skin assisted by microwave. **Carbohydrate polymers**, v. 64, n. 4, p. 548-552, 2006.