



TATIANA SILVEIRA JUNQUEIRA DE MORAES

**MICROBIOTA DA RIZOSFERA DE PLANTAS
DE TOMATE CULTIVADAS EM
SUBSTRATOS À BASE DE COMPOSTO PÓS-
CULTIVO DE COGUMELOS *AGARICUS***

LAVRAS-MG

2016

TATIANA SILVEIRA JUNQUEIRA DE MORAES

**MICROBIOTA DA RIZOSFERA DE PLANTAS DE TOMATE
CULTIVADAS EM SUBSTRATOS À BASE DE COMPOSTO PÓS-
CULTIVO DE COGUMELOS *AGARICUS***

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola, para a
obtenção do Título de Mestre

Dr. Eustáquio Souza Dias

Orientador

LAVRAS-MG

2016

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Moraes, Tatiana Silveira Junqueira de.

Microbiota da rizosfera de plantas de tomate cultivadas em
substratos à base de composto pós-cultivo de cogumelos *Agaricus* /
Tatiana Silveira Junqueira de Moraes. – Lavras : UFLA, 2016.
45 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)—Universidade Federal de
Lavras, 2016.

Orientador(a): Eustáquio Souza Dias.

Bibliografia.

1. Microbiota. 2. DGGE. 3. Rizosfera. 4. Cogumelo. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

TATIANA SILVEIRA JUNQUEIRA DE MORAES

**MICROBIOTA DA RIZOSFERA DE PLANTAS DE TOMATE
CULTIVADAS EM SUBSTRATOS À BASE DE COMPOSTO PÓS-
CULTIVO DE COGUMELOS *AGARICUS***

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de
Lavras, como parte das
exigências do Programa de
Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola, para a
obtenção do Título de Mestre

APROVADA em 15 de março de 2016.

Dra. Patrícia Gomes Cardoso	UFLA
Dr. Ricardo Magela de Souza	UFLA
Dr. Diego Cunha Zied	UNESP

Dr. Eustáquio Souza Dias

Orientador

LAVRAS-MG

2016

A Deus,
Aos meus familiares,
Aos meus amigos e namorado,
A todos os envolvidos na conclusão desse trabalho.

Dedico!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por estar comigo em cada obstáculo e em cada vitória. Quem tem fé nunca está sozinho.

Aos meus pais, Liliana e Gabriel, minha irmã Larissa, pelo incentivo em todos os momentos, bons ou ruins. Aos meus avós, Lúcia e Wilson, pelas orações e a todos os meus familiares, por sempre acreditarem em mim.

À minha pequena família em Lavras, Carol e Fernanda, por tornarem esses anos de UFLA os melhores.

Ao Alex, pelo carinho, incentivo e companheirismo sempre.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola (PPGMA), pela oportunidade concedida para a realização do Mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos professores do PPGMA, pelos ensinamentos transmitidos.

Ao professor Eustáquio Souza Dias, pela orientação, pela oportunidade da realização deste trabalho, pela confiança e paciência.

Aos colegas de Laboratório, Ma. Carolina, Jady, Moysa, Cibelli, Dra. Lúcia, Dra. Manuela, Carlos, Pedro e Paulinho, por terem me recebido tão bem, desde o primeiro dia e por estarem sempre dispostos a me ensinar.

Ao Dr. Thiago, pelo acompanhamento, desde o início do projeto, pela boa vontade em ensinar e paciência.

Aos professores Dr. Diego, Dr. Ricardo e Dra. Patrícia, membros da banca examinadora, pela disponibilidade.

À secretária do PPGMA, Rose, pela boa vontade e empenho em sempre ajudar os alunos.

Agradeço!

“Seja tolo. Seja honesto. Seja bom.”

Ralph Waldo Emerson

RESUMO GERAL

A produção de mudas de tomateiro é uma importante etapa durante o cultivo dessa importante hortaliça, uma vez que a qualidade está normalmente associada com o sucesso da produção. Existem diferentes substratos comerciais disponíveis no mercado, para a produção de mudas de hortaliças, entretanto, substratos alternativos podem ser utilizados, tanto para a redução dos custos de produção como para a produção de mudas de melhor qualidade. O uso do composto pós-cultivo de cogumelos (SMS- Spent Mushroom Substrate) é uma excelente alternativa aos substratos comerciais para esse propósito, porque permite uma destinação nobre para o resíduo da cadeia produtiva de cogumelos, bem como pode contribuir para a produção de mudas de melhor qualidade. Trabalhos anteriores demonstraram que a utilização do SMS de *Agaricus subrufescens* para a produção de mudas de tomateiro resultou em maior produtividade. Vários fatores podem estar envolvidos nesse efeito positivo, dentre eles a microbiota presente no SMS. Por isso, é importante conhecer a microbiota presente nesse material e sua relação com a planta, para que essa associação possa ser feita da melhor maneira possível. Este trabalho foi realizado com o objetivo de identificar a microbiota presente na rizosfera de mudas de tomate cultivadas em SMS das espécies *Agaricus subrufescens* e *Agaricus bisporus*, acrescidos ou não de substrato comercial, além de identificar a microbiota presente no substrato comercial (Tropstrato) e comparar os tratamentos. Foram utilizadas sementes de tomate da cultivar Santa Cruz Kada (*Solanum lycopersicum*), que, após germinação, foram transplantadas para vasos contendo as formulações de compostos pós-cultivo de cogumelos puro, ou associado a substratos comerciais. De cada tratamento, foram obtidas amostras do sistema radicular, a partir do qual foi feita a extração de DNA com o objetivo de análise molecular por DGGE e sequenciamento para a identificação das espécies dominantes. O sequenciamento dos amplicons foi realizado na MacroGen USA (Rockville, Maryland, USA) e as sequências foram comparadas com a base de dados do GenBank. Entre os eucariotos, foram encontradas espécies de *Chaetomium globosum*, *Arthrobotrys amerospora*, *Geastrum floriforme*, *Chrysosporium chiropterorum*, *Pleurotus* sp, *Trichosporon* sp. e *Candida mesorugosa*. Entre procariotos, foram encontradas espécies de alfa proteobactérias, *Actinoplanes* sp., *Aeromicrobium* sp. e *Caulobacter* sp.

Palavras-chave: Microbiota. DGGE. Rizosfera. Cogumelo.

GENERAL ABSTRACT

The production of tomato seedlings is an important stage during the cultivation of this vegetable, given that its quality is normally associated to the success of production. There are different commercial substrates available in the market for the production of vegetable seedlings. However, alternative substrates can be used for both reducing production costs and for the production of higher quality seedlings. The use of Spent Mushroom Substrate – SMS, is an excellent alternative to commercial substrates for this purpose, since it allows a noble destination for the residue of the mushroom production chain, as well as contributes for the production of better quality seedlings. Previous papers showed that the use of *Agaricus subrufescens* SMS for the production of tomato seedlings resulted in higher productivity. Many factors can be involved in this positive effect, among which are the microbiota present in the SMS. Thus, it is important to know the microbiota present in this material and its relation to the plant, in order for this association to be done in the best manner possible. This work was conducted with the objective of identifying the microbiota present in the rhizosphere of tomato seedlings cultivated in SMS of species *Agaricus subrufescens* and *Agaricus bisporus*, added or not with commercial substrate, in addition of identifying the microbiota present in the commercial substrate (Tropstrato) and comparing the treatments. We used the seeds of tomato seedlings, cultivar Santa Cruz Kada (*Solanum lycopersicum*), which, after germination, were transplanted to pots containing the formulation of pure spent mushroom substrate, or associated to commercial substrates. From each treatment, samples of the root system were obtained, from which we extracted DNA with the objective of conducting molecular analysis by DGGE, and sequencing to identify the dominant species. The sequencing of the amplicons was conducted at Macrogen USA (Rockville, Maryland, USA), and the sequences were compared based on data from the GenBank. Among the eukaryotes, we found species of *Chaetomium globosum*, *Arthrobotrys amerospora*, *Geastrum floriforme*, *Chrysosporium chiropterorum*, *Pleurotus* sp, *Trichosporon* sp. and *Candida mesorugosa*. Among the prokaryotes, we found species of alpha proteobacteria, *Actinoplanes* sp., *Aeromicrobium* sp. and *Caulobacter* sp.

Keywords: Microbiota. DGGE. Rhizosphere. Mushroom.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2

- Figura 1 - Padrão de bandas de DGGE da região da rizosfera em plantas de tomate cultivadas em compostos pós-cultivo de cogumelos das espécies *Agaricus subrufescens* e *Agaricus bisporus*, acrescidos ou não de substrato comercial (Tropstrato), nas semanas 1, 4, 8, 9 e 11. AS100 (100% *A. subrufescens*), AS50 (50% *A. subrufescens*+50% Tropstrato), AB100 (100% *A. bisporus*), AB50 (50% *A. bisporus*+50% Tropstrato), para eucariotos (A) e procariotos (B)..... 33
- Figura 2 -Padrão de bandas de DGGE da região da rizosfera de plantas de tomate cultivadas em substrato comercial (Tropstrato), ao longo das semanas 1, 4, 8, 9 e 11. C (100% substrato comercial [Tropstrato]), para eucariotos (C) e procariotos (D)..... 34

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1 - Produção estimada de cogumelos comestíveis no Brasil	15
---	----

Capítulo 2

Tabela 1 - Tratamentos referentes aos substratos utilizados para o transplante das mudas de tomateiro. AS100: 100% <i>A. subrufescens</i> ; AS50: 50% <i>A. subrufescens</i> +50% Tropstrato®; AB100: 100% <i>A. bisporus</i> ; AB50: 50% <i>A. bisporus</i> +50% Tropstrato®; Controle: 100% Tropstrato®.....	31
Tabela 2 - Identidade de nucleotídeos utilizando banco de dados Blast (ncbi) das sequências recuperadas das bandas do DGGE para eucariotos e procariotos. Amostra de SMS de <i>Agaricus</i>	35
Tabela 3 - Identidade de nucleotídeos utilizando banco de dados Blast (ncbi) das sequências recuperadas das bandas do DGGE para eucariotos e procariotos. Amostras de substrato comercial (Tropstrato).....	38

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	13
1. INTRODUÇÃO GERAL	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 Cogumelos	13
2.1.1 O gênero <i>Agaricuse</i> sua produção comercial	14
2.1.1.1. As espécies <i>Agaricus subrufescens</i> e <i>Agaricus bisporus</i> ..	15
2.2 Compostagem e composto pós-cultivo de cogumelos	16
2.3 Composto de cogumelos como substrato para produção de mudas	17
2.4 Microrganismos no composto pós-cultivo de cogumelos	17
2.5 Microrganismos na camada de cobertura	18
2.6 Rizosfera	19
2.7 Microrganismos na região da rizosfera de tomates	20
2.8 PCR e DGGE no estudo da ecologia microbiana do solo	20
REFERÊNCIAS	22
CAPÍTULO 2	27
1. INTRODUÇÃO	29
2. MATERIAL E MÉTODOS	31
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS	42

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO GERAL

Levando em consideração a atual demanda por alimentos produzidos sem adição de produtos químicos, a agricultura orgânica tem se mostrado uma boa alternativa com a oferta de produtos saudáveis ao consumidor. Além disso, há uma crescente preocupação com o descarte de resíduos no ambiente. Com isso, estudos têm sido feitos com o objetivo de avaliar o uso dos resíduos da agricultura como substratos para a produção de alimentos orgânicos. No caso de compostos pós-cultivo de cogumelos, estes apresentam uma rica microbiota, que pode ser benéfica para o desenvolvimento de hortaliças, como o tomate.

O tomate apresenta grande importância econômica, sendo consumido em todo o mundo. Entretanto, é bastante suscetível a diversas doenças, o que acaba por incentivar o uso de produtos agroquímicos durante sua produção. Assim, é importante estudar alternativas nesse processo, como o uso do composto pós-cultivo de cogumelos. Os microrganismos na região da rizosfera apresentam estreita relação com as plantas e podem protegê-la, por meio de diferentes mecanismos, além de produzir substâncias que auxiliem no seu crescimento.

É importante, portanto, identificar a microbiota presente na rizosfera de plantas de tomate cultivadas em composto pós-cultivo de cogumelos do gênero *Agaricus*, associados ou não a substrato comercial, bem como identificar a microbiota presente no substrato comercial, pois assim se torna possível compreender a relação desses microrganismos com a planta e desenvolver métodos para otimizar a sua utilização.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cogumelos

Os cogumelos são frutificações de alguns tipos de fungos das divisões Basidiomycota e Ascomycota. Os cogumelos podem ser divididos em seis

categorias: comestíveis, não-comestíveis, alucinógenos, medicinais, venenosos e uma categoria mista, com propriedades menos definidas. Sua produção comercial como fonte de alimento tem sido feita em muitos países e, no Brasil, vem crescendo nos últimos anos (CHANG, 2006; MADIGAN et al., 2010).

Segundo dados da International Society for Mushroom Science, entre as regiões de maior cultivo de cogumelos estão Europa, América do Norte e China, sendo *Agaricus bisporus* (champignon de Paris) a espécie mais cultivada do mundo, correspondendo a 38% da produção mundial.

Os cogumelos são conhecidos desde a antiguidade, em razão da sua utilização pelo homem, como alimento de elevado valor nutritivo e terapêutico. Algumas espécies têm sido usadas para tratamento de distúrbios gastrointestinais, algumas formas de câncer, bronquite, entre outras doenças, em diversas regiões do mundo, pois podem apresentar cerca de 130 atividades farmacológicas, incluindo antitumoral, imunomoduladora, antioxidante, protetora cardiovascular, antiviral, antibacteriana, antiparasitária, hepatoprotetora e antidiabética (WASSER, 2011).

De acordo com Taveira e Novaes (2007), os cogumelos comestíveis não representam riscos à saúde humana, desde que bem conservados, processados, cultivados adequadamente e tomados os devidos cuidados na identificação das espécies que podem ser ingeridas.

2.1.1 O gênero *Agaricuse* sua produção comercial

O gênero *Agaricus* é um importante gênero de cogumelos, contendo centenas de espécies, tanto venenosas quanto comestíveis (BAS, 1991; MATA; MEDEL; SALMONES, 2011). Geralmente, as espécies desse gênero possuem frutificações carnosas, com píleos grandes e globosos que, com o tempo, passam a ser planos e podem apresentar coloração branca, cinza ou marrom.

Em razão de suas características, o gênero tem sido cultivado e comercializado há muito tempo, para fins alimentícios e terapêuticos. Além disso, o cultivo desses cogumelos é importante, devido à reciclagem de resíduos agrícolas e agroindustriais.

Poucos são os dados a respeito da produção de cogumelos no Brasil, porém, na última década, a produção de cogumelos do gênero *Agaricus* era da ordem de 5 a 7 kg de cogumelos frescos por 100 kg de substrato úmido (4 a 6 kg de cogumelos frescos por m²), em Mogi das Cruzes, SP, principal região de cultivo. Há uma estimativa de que a produção brasileira chegue a milhares de toneladas anuais, como mostra a tabela 1. Outros países produtores são China, Japão e Coreia (BRAGA; MONTINI; SALIBE, 2006; SILVA, 2014; EIRA, 2000).

Tabela 1 – Produção estimada de cogumelos comestíveis no Brasil

Espécies de cogumelos cultivadas no Brasil	Produção estimada (toneladas/ano)
<i>Agaricus bisporus</i> (Champignon de Paris)	8.000
<i>Pleurotus</i> spp.	2.000
<i>Lentinula edodes</i> (Shiitake)	1.500
<i>Agaricus subrufescens</i>	500
Outros	50

Fonte: Adaptado de Associação Nacional de Produtores de Cogumelos (ANPC)

2.1.1.1. As espécies *Agaricus subrufescens* e *Agaricus bisporus*

O cogumelo *Agaricus subrufescens*, conhecido como cogumelo do sol ou cogumelo medicinal ou ainda como *Royal Sun Agaricus* ou *Almond Portobelo*, no exterior, tem sido cultivado e utilizado no Brasil e no mundo como alimento saudável. Suas características medicinais são bem conhecidas e essa espécie tem sido largamente utilizada como terapia alternativa ao

câncer, em decorrência de suas propriedades antitumorais (WISITRASSAMEEWONG et al., 2012).

Possui píleo semiglobuloso de cor marrom-clara a creme, com pequenas escamas brancas na parte superior. O estipe estreita-se na junção com o píleo (4-13 cm de comprimento por 1-3 cm de diâmetro), com espessura constante ou base bulbosa de coloração branca (ZIED, 2011). Essa espécie é encontrada, principalmente, em climas tropicais e subtropicais, tendo sido descrita, pela primeira vez, em 1893, nos Estados Unidos e descoberta no Brasil, na década de 60.

A espécie *Agaricus bisporus* tem sua origem nas regiões de clima temperado e, por isso, necessita de temperaturas mais baixas para a indução de sua frutificação (FIGUEIRÊDO; DIAS, 2014). Possuem coloração branca e o formato do píleo depende do estágio em que se encontram no momento da colheita, podendo ser: formato de botão, chapéu fechado, chapéu aberto ou formato plano de coloração marrom.

2.2 Compostagem e composto pós-cultivo de cogumelos

Nos sistemas de produção de cogumelos, normalmente há produção de resíduos orgânicos que, muitas vezes, não têm um destino ambientalmente adequado. O manejo e uso técnico correto desses resíduos orgânicos são necessários para minimizar os impactos negativos no meio ambiente (PEIXOTO, 2011).

A compostagem é um processo de decomposição decorrente da ação dos microrganismos. Sua aplicação proporciona tratamento e destino útil para os resíduos orgânicos, evitando seu acúmulo e melhorando a estrutura dos solos, sendo útil como adubo para a produção agrícola (ROCHA et al., 2008).

O composto pós-cultivo possui nutrientes como nitrogênio, cálcio, fósforo, potássio, magnésio e enxofre, além de micronutrientes, como zinco, ferro, cobre, manganês que são assimilados pelas raízes (SOUSA, 2012).

De acordo com Uzun (2006), o composto pós-cultivo de cogumelos pode ser utilizado como fertilizante, pois seus nutrientes são liberados mais

lentamente e por um período maior de tempo, assim as plantas podem usá-los com maior eficiência. Zhang et al. (2012) testaram o crescimento de tomate em composto pós-cultivo de cogumelos e obtiveram resultados positivos no crescimento da planta, atribuindo esses resultados à absorção de nutrientes fornecidos pelo composto.

2.3 Composto de cogumelos como substrato para produção de mudas

O composto pós-cultivo de cogumelos pode ser utilizado como composto orgânico, já que a microbiota presente nele pode garantir a fitossanidade da cultura. Materiais orgânicos adequadamente compostados, aumentam a aeração do solo, a capacidade de retenção e infiltração de água e reduzem a densidade do solo. Esse tipo de substrato pode ser uma fonte importante de espécies de microrganismos, potencialmente indutores de resistência a doenças (LOPES et al., 2015; LOURES, 2001).

Por isso, estudos têm sido feitos com esse tipo de substrato para a produção de mudas e têm apresentado resultados positivos (LOPES et al., 2015; RAMOS et al., 2008; TEIXEIRA, 2014).

Dependendo da espécie cultivada, os substratos exauridos têm particularidades que lhes conferem algumas características de interesse para o uso em produção de mudas, como capacidade de capturar nematoides, podendo ser utilizado no controle biológico destes (KOHARI, 2013).

2.4 Microrganismos no composto pós-cultivo de cogumelos

Por ser uma mistura de substâncias orgânicas, o composto possui grande quantidade de elementos que favorecem o crescimento de uma série de organismos, de modo que a incidência dos microrganismos depende das condições desse composto (GUIMARÃES, 2014).

Durante o processo de compostagem, ocorrem mudanças nas condições nutricionais e temperatura às quais os microrganismos se adaptam, e a conseqüente alteração nas condições ambientais provoca seu crescimento em quantidade e diversidade.

Ocorre então uma alternância de microrganismos no substrato que resulta no composto maduro ao final do processo. Esses microrganismos, juntamente com a qualidade da matéria-prima são responsáveis pela qualidade final do composto.

Os microrganismos presentes nesse composto possuem importantes funções, como degradação do substrato inicial, da matéria orgânica e eliminação de alguns organismos patogênicos.

Entre as espécies de fungos que podem ser isoladas de compostos, podem ser citadas: *Aspergillus fumigatus*, *Chaetomium thermophilum*, *Scytalidium thermophilum*, *Thermomyces lanuginosus*, *Thermomyces ibadanensis*, *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Torula thermophila*, *Chaetomium* spp., *Malbranchea sulfurea*, *Myriococcum thermophilum*, *Stilbella thermophila*, *Thielavia terrestres*. Entre as bactérias, podem ser encontradas as do gênero *Bacillus*, e gêneros de actinobactérias, como *Streptomyces* e *Thermoactinomyces* sendo *Micromonospora* spp. e *Streptomyces* spp. actinomicetos com influência favorável no crescimento de *A. bisporus*. (MARTOS, 2009; SOUZA et al., 2014; STECKLING; LUZ; SALGADO-NETO, 2014).

Alguns desses microrganismos possuem atividade antagonista a fitopatógenos em tomates, como *Streptomyces* contra *Rhizoctonia solani* (SOUZA; FARIAS, 2013), actinobactérias contra *Ralstonia solanacearum* (MOURA; ROMEIRO; NEVES, 1998), além de microrganismos que atuam na indução de crescimento, como *Bacillus subtilis* (ARAÚJO; MENEZES, 2009).

2.5 Microrganismos na camada de cobertura

O termo “camada de cobertura” é utilizado para denominar a etapa onde, no cultivo de cogumelos Agaricáceos, é adicionada terra e/ou outros materiais sobre o substrato colonizado. Essa etapa induz a frutificação e promove a produtividade do cogumelo. Atualmente, muitos são os materiais que podem ser utilizados como camada de cobertura, porém, é necessário

seguir alguns parâmetros de qualidade, tais como: textura, porosidade, valores de pH, concentração de sais e de material orgânico não decomposto, teores de magnésio, quantidade de contaminantes e pragas, com o objetivo de obter maior qualidade na produção (SILVA et al., 2007; ZIED et al., 2010).

A presença de bactérias na camada de cobertura é importante para a formação do corpo de frutificação, sendo o gênero *Pseudomonas* o mais abundante (cerca de 50%) (COLAUTO; EIRA, 1998). Entre as bactérias que podem ser encontradas na camada de cobertura de cogumelos da espécie *A. subrufescens*, podemos citar: *Salmonella enteritidis*, *Shigella boydii*, *Pasteurella multocida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium II*, *Pseudomonas cepacia*, *Shigella flexner*, *Yersinia enterocolitica* e *Pseudomonas aeruginosa* (SILVA et al., 2007).

Entre os microrganismos eucariotos, já foram encontrados em amostras da camada de cobertura: *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. (competidores) e *Trichoderma* sp. (parasitas) (MARTOS, 2013).

2.6 Rizosfera

As plantas no solo oferecem um ambiente altamente específico para a ocorrência natural de comunidades microbianas e, durante a evolução, os microrganismos do solo desenvolveram estratégias que permitiram sua interação com as plantas. Essa interação pode ser benéfica, neutra ou prejudicial e o grau de interação dos microrganismos com a planta depende da influência das raízes (VAN ELSAS et al., 2006).

A rizosfera é definida como uma região de enorme diversidade microbiana, sendo a associação entre esses microrganismos e a planta importante para a saúde das mesmas. A comunidade microbiana é apontada como um importante indicador de qualidade do solo (BERENDSEN; PIETERSE; BAKKER, 2012; ZILLI et al., 2003).

Os exsudatos das raízes representam importantes fontes de substratos para os microrganismos da rizosfera e influenciam a estrutura da comunidade microbiana presente. A composição desses substratos difere entre espécies de

plantas, cultivares e estágio de desenvolvimento da planta, além de parâmetros do solo, como pH, textura do solo, disponibilidade ou limitação de nutrientes e exposição a patógenos. Dependendo dos exsudatos liberados pela planta, um microrganismo pode ser estimulado ou inibido, alterando a biomassa do solo. Alguns dos gêneros mais comumente encontrados na rizosfera de plantas cultivadas são: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Acaulospora*, *Fusarium*, *Gigaspora*, *Glomus*, *Mucor*, *Penicillium*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Scutellospora*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Bacillus* e *Streptomyces* (CARDOSO; FREITAS, 1992 citado por DANTAS et al., 2009; SIQUEIRA; FRANCO, 1988 citado por DANTAS et al., 2009; ELEIN et al., 2005; VAN ELSAS et al., 2006).

Pseudomonas e *Serratia*, encontradas na rizosfera, possuem a capacidade de produzir fitormônios, como a auxina, que promovem o crescimento da planta e o desenvolvimento da raiz (VAN ELSAS et al., 2006).

2.7 Microrganismos na região da rizosfera de tomates

Entre as espécies de bactérias já encontradas na região da rizosfera de tomateiros estão: *Paenibacillus fujiensis*, *Enterococcus avium*, *Bacillus* sp., *Anaeromyxobacter dehalogenans*, *Mycobacterium gordonae* e *Patulibacter minatonensis*.

Entre as espécies de eucariotos já encontradas nessa região, podemos citar: *Scenedesmus* sp., *Emmonsia parva*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium oxysporum*, *Alternaria tenuissima* e *Olpidium brassicae* (CORDERO-RAMIREZ et al., 2012; SCOTT, 2014).

2.8 PCR e DGGE no estudo da ecologia microbiana do solo

Métodos moleculares baseados na amplificação do DNA de amostras de solo pela reação em cadeia da polimerase (PCR) - combinada com a eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE), têm sido utilizados para a análise da diversidade e da dinâmica de comunidades microbianas do solo, em função de variações ambientais ou antrópicas e para afiliação

filogenética de membros de comunidades microbianas. O uso do DGGE na análise de comunidades microbianas em amostras complexas apoia-se no pressuposto de que sequências genômicas diferentes, em pelo menos um par de bases, migrarão para posições diferentes no gel, sendo a separação de sequências de DNA baseada no seu comportamento de dissociação (MARRIEL et al., 2005). Essa técnica oferece alta sensibilidade e é menos laboriosa que outras estratégias envolvendo clonagem e enzimas de restrição.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, F. F.; MENEZES, D. Indução de resistência a doenças foliares em tomateiro por indutores biótico (*Bacillus subtilis*) e abiótico (Acibenzolar-S-Metil). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 35, n. 3, p. 169-172, jan./fev. 2009.
- BAS, C. A short introduction to the ecology, taxonomy and nomenclature of the genus *Agaricus*. **Mushroom Science**, Amsterdam, v. 15, n. 1, p. 25-39, 1991.
- BERENDSEN, R. L.; PIETERSE, C. M. J.; BAKKER, P. A. H. M. The rhizosphere microbiome and plant health. **Trends in Plant Science**, Cambridge, v. 17, n. 8, p. 478-486, Aug. 2012.
- BRAGA, G. C.; MONTINI, R. M. C.; SALIBE, A. B. Parâmetros da produção de *Agaricus blazei* sob diferentes condições ambientais de cultivo. **Scientia Agraria Paranaensis**, Cascavel, v. 5, n. 1, p. 1-10, jul. 2006.
- CHANG, S.T. The world mushroom industry: trends and technological development. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, Haifa, v. 8, n. 4, p. 297-314, Oct. 2006.
- COLAUTO, N. B.; EIRA, A. F. Avaliação quantitativa da comunidade bacteriana na camada de cobertura de *Agaricus bisporus*. **Energia na Agricultura**, Botucatu, v. 13, n. 2, p. 15-26, maio 1998.
- CORDERO-RAMIREZ, J. D. et al. Rhizosphere microorganisms associated to tomato in na agroecosystem from Guasave Valley, Sinaloa, Mexico. **Revista Mexicana de Biodiversidad**, México, v. 83, n. 3, p. 712-730, Sept. 2012.
- DANTAS, J. S. et al. Interações entre grupos de microrganismos com a rizosfera - **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, Guarapuava, v. 2, n. 2, p. 213-224, 2009.
- EIRA, A. F. Cultivo de cogumelos (Compostagem, condução e ambiente). In: REUNIÃO ITINERANTE DE FITOSSANIDADE DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 3., 2000, Mogi das Cruzes. **Anais...** Mogi das Cruzes: Suprema, 2000. p. 83-95.
- ELEIN, T. A. et al. Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum*,

Mill). **Revista Colombiana de Biotecnología**, Bogotá, v. 7, n. 2, p. 47-54, Dec. 2005.

FIGUEIRÊDO, V. R.; DIAS, E. S. Cultivo do champignon em função da temperatura. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 2, p. 241-246, fev. 2014.

GUIMARÃES, S. E. **Estudo da microbiota durante a fase II da compostagem para produção do substrato de cultivo do cogumelo *Agaricus blazei***. 2014. 69 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

KOHARI, E. K. **Produção do cogumelo comestível *Pleurotus ostreatus* em resíduos lignocelulósicos e avaliação das características do substrato exaurido visando sua utilização como fertilizante orgânico**. 2013. 83 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2013.

LOPES, R. X. et al. Application of spent *Agaricus subrufescens* compost in integrated production of seedlings and plants of tomato. **International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture**, Tehran, v. 4, n. 3, p. 211-218, Sept. 2015.

LOURES, J. L. **Estabelecimento e avaliação do sistema de produção de tomate denominado FITO, em estufa e campo**. 2001. 109 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de brock**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160 p.

MARTOS, E. T. **Aditivos microbianos no processo de compostagem e na camada de cobertura para o cultivo do cogumelo *Agaricus brasiliensis***. 2009. 67 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

MARRIEL, I. E. et al. **Aplicação da técnica eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) na caracterização de microrganismos dominantes na rizosfera de plantas cultivadas em solo ácido**. Minas Gerais: Embrapa Milho e Sorgo, 2005. (Circular Técnica, 72).

MARTOS, E. T. **Estudos de camada de cobertura e indução da frutificação do cogumelo *Agaricus subrufescens***. 2013. 82 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

MATA, G.; MEDEL, R.; SALMONES, D. Preliminary survey of the diversity of the genus *Agaricus* in Mexico. In: PROCEEDINGS OF THE

INTERNATIONAL CONFERENCE ON MUSHROOM BIOLOGY AND MUSHROOM PRODUCTS, 7., 2011, Bordeaux. **Anais...Bordeaux: WSMBMP-INRA**, 2011. p. 134-139.

MOURA, A. B.; ROMEIRO, R. S. da; NEVES, M. C. P. Bioensaio para avaliação massal de actinomicetos antagonistas a *Ralstonia solanacearum*, em tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 12, p. 2065-2072, dez. 1998.

PEIXOTO, R. T. G. dos. **Sistema de produção de alface orgânico**. Brasília: Embrapa Soços, 2011.

RAMOS, S. J. et al. Tomato seedling production in substrate containing coconut fiber and mushroom culture waste. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 3, n. 3, p. 237-241, jul./set. 2008.

ROCHA, C. O. D. et al. Utilização da compostagem no tratamento de resíduos sólidos e seus benefícios para o meio ambiente. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental**, Campinas, v. 2, n. 1, 2008. p. 24-36.

SCOTT, G. **Monitoring occurrence and relative levels of rhizosphere microorganisms on Rockwool tomato crops across the 2012/2013 growing season**. 2014. 132 p. Tese (Doutorado) - University of Nottingham, Nottingham, 2014.

SILVA, A. C.; JORGE, N. Cogumelos: compostos bioativos e propriedades antioxidantes. **Journal of Health Sciences**, Lavras, v. 13, nesp., p. 375-384, 2011.

SILVA, M. E. **Controle biológico de nematoides gastrintestinais em bovinos: avaliação da eficácia dos fungos predadores *Duddingtonia flagrans* e *Monacrosporium thaumasium* produzidos em sistema bifásico e formulados em matriz de alginato de sódio**. 2014. 133 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

SILVA, V. A. et al. Isolamento e identificação de bactérias presentes nos solos de cobertura utilizados no cultivo do cogumelo *Agaricus blazei* Murril. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 5, p. 1364-1373, set./out. 2007.

SOUZA, A. E. F.; FARIAS, A. de. *Streptomyces* sp no controle de *Fusarium* spp e *Rhizoctonia solani*. **Biofar, Revista de Biologia e Farmácia**, Campina Grande, v. 9, n. 1, p. 36-41, mar./maio 2013.

SOUSA, M. N. **Avaliação do uso do composto clássico na produção de cogumelos (*Agaricus*)**. 2012. 25 p. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Engenharia Ambiental) - Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2012.

SOUZA, T. P. et al. Analysis of thermophilic fungal populations during phase II of composting for the cultivation of *Agaricus subrufescens*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 30, n. 9, p. 2419-2425, May 2014.

STECKLING, S. D. M.; LUZ, C. R. da; SALGADO-NETO, G. Fungos contaminantes do composto para cultivo de cogumelo *Agaricus Bisporus* (Lange) Imbach. **Revista Eletrônica de Biologia**, São Paulo, v. 6, n. 3, p. 303-324, dez. 2014.

TAVEIRA, V. C.; NOVAES, M. R. C. G. Consumo de cogumelos na nutrição humana: uma revisão da literatura. **Ciências Saúde**, Brasília, v. 18, n. 4, p. 315-322, jan./mar. 2007.

TEIXEIRA, C. P. **Produção de mudas e frutos de morangueiro em diferentes sistemas de cultivo**. 2014. 74 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

UZUN, I. Use of spent mushroom compost in sustainable fruit production. **Journal of Fruit and Ornamental Plant Research**, Oxford, v. 12, nesp., p. 157-165, Oct. 2004.

VAN ELSAS, J. D. et al. (Ed.). **Modern soil microbiology**. New York: CRC Press, 2006. 672 p.

WASSER, S. P. Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 89, n. 5, p. 1323-1332, Mar. 2011.

WISITRASSAMEEWONG, K. et al. *Agaricus subrufescens*: a review. **Saudi Journal of Biological Sciences**, Washington, v. 19, n. 2, p. 131-146, Apr. 2012.

ZHANG, R. H. et al. Use of spent mushroom substrate as growing media for tomato and cucumber seedlings. **Pedosphere**, Oxford, v. 22, n. 3, p. 333-342, June 2012.

ZIED, D. C. et al. Production of *Agaricus blazei* ss. Heinemann (*A. brasiliensis*) on different casing layers and environments. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 26, n. 10, p. 1857-1863, Oct. 2010.

ZIED, D. C. **Produtividade e teor de B-glucona de *Agaricus subrufescens* Peck (*Agaricus blazei* (Murrill) ss. Heinemann), em função de diferentes práticas de cultivo e conversões energéticas.** 2011. 106 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu, Botucatu,2011.

ZILLI, J. E. et al. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v. 20, n. 3, p. 391-411, set./dez. 2003.

CAPÍTULO 2

MICROBIOTA DA RIZOSFERA DE PLANTAS DE TOMATEIRO CULTIVADAS EM SUBSTRATOS À BASE DE COMPOSTO PÓS- CULTIVO DE COGUMELOS *AGARICUS*

RESUMO

A produção de mudas de tomateiro é conduzida em substratos comerciais com propriedades adequadas para a boa formação da parte aérea e da raiz. O composto pós-cultivo de cogumelos (do inglês “Spent Mushroom Substrate” ou SMS) apresenta algumas vantagens em relação aos substratos comerciais para a qualidade das mudas de hortaliças, que podem ser proporcionados pela presença de uma rica microbiota, trazendo maior equilíbrio e maior competição com microrganismos patogênicos, além do controle biológico de patógenos e nematoides. É importante conhecer a microbiota presente nesse material e sua relação com a planta, para que essa associação possa ser feita da melhor maneira possível. Este trabalho teve o objetivo de identificar a microbiota presente na rizosfera de mudas de tomate produzidas em SMS de cogumelos das espécies *Agaricus subrufescens* e *Agaricus bisporus*, acrescidos ou não de substrato comercial. A microbiota foi analisada por DGGE e amostras representativas de DNA foram sequenciadas para identificação das espécies. Entre os eucariotos, foram encontradas espécies de *Chaetomium globosum*, *Arthrobotrys amerospora*, predominantes no SMS de *A. subrufescens*, e *Geastrum floriforme*, *Chrysosporium chiropterum*, *Pleurotus* sp., e *Trichosporon* sp. no SMS de *A. bisporus*. Entre procariotos, a maioria das amostras não foi identificada, apesar de maior diversidade, sugerindo um grande número de espécies ainda não classificadas ou cujas sequências não foram ainda depositadas.

Palavras-chave: SMS, produção de mudas, tomateiro.

ABSTRACT

The production of tomato seedlings is conducted on commercial substrates with adequate properties for the good formation of the aerial part and root. The Spent Mushroom Substrate, or SMS, presents a few advantages in relation to commercial substrates regarding the quality of the vegetable seedlings, which may be provided by the presence of a rich microbiota, bringing higher balance and competition with pathogenic microorganisms, in addition to the biological control of pathogens and nematodes. It is important to know the microbiota present in this material and its relation to the plant, in order for this association to occur in the best manner possible. This work had the objective of identifying the microbiota present in the rhizosphere of tomato seedlings produced in SMS of *Agaricus subrufescens* and *Agaricus bisporus* mushrooms, added or not with commercial substrate. The microbiota was analyzed by DGGE and the DNA representative samples were sequenced in order to identify the species. Among the eukaryotes, the *Chaetomium globosum*, *Arthrotrrys amerospora* species, predominant in the *A. subrufescens* SMS, and *Geastrum floriforme*, *Chrysosporium chiropterum*, *Pleurotus* sp., and *Trichosporon* sp. in the *A. bisporus* SMS. Among the prokaryotes, most samples could not be identified despite higher diversity, suggesting a large number of species not yet classified or of which sequences are not yet available.

Keywords: SMS, seedling production, tomato plant.

1. INTRODUÇÃO

O tomate (*Solanum lycopersicum*) é um fruto originário das Américas Central e do Sul, consumido em todo o mundo, cujas mudas podem ser produzidas em diferentes substratos, como fibra de coco verde, serragem, casca de arroz e o composto pós-cultivo de cogumelos, como os do gênero *Agaricus* (CARRIJO et al., 2004; LOPES et al., 2015).

Os compostos pós- cultivo de *Agaricus* spp. podem ser utilizados como biorremediadores, suplementos na alimentação animal e substratos na agricultura, se tratados apropriadamente, constituindo uma excelente alternativa ao problema de descarte de resíduos agrícolas e agroindustriais (RINKER, 2002; SOUSA, 2012).

LOPES et al. (2015) relataram a utilização do SMS de *Agaricus subrufescens*, em diferentes proporções, para a produção de mudas de tomateiro, avaliando não somente a qualidade das mudas produzidas, mas também o desempenho das mesmas após o transplante. Os autores não observaram um efeito direto do SMS sobre a qualidade das mudas considerando os parâmetros normalmente utilizados, como massa de parte aérea, massa de raiz, etc. Entretanto, as mudas produzidas e em substrato com SMS apresentaram uma produtividade superior em relação ao controle, sendo os melhores resultados obtidos no substrato com 100% de SMS.

Diferentes fatores podem estar envolvidos nesse processo, dentre os quais pode-se destacar a presença de polissacarídeos como as β -glucanas oriundas do micélio do cogumelo cultivado, e a rica microbiota presente nesse tipo de composto, a qual poderia influenciar a microbiota da rizosfera das mudas produzidas nesse tipo de substrato.

Assim, torna-se importante conhecer a microbiota presente no SMS dessas espécies de cogumelos, bem como comparar a microbiota da rizosfera de mudas produzidas no SMS de diferentes espécies de cogumelos e do substrato comercial. Para isso, além das tradicionais técnicas de isolamento, cultivo e identificação de microrganismos cultiváveis, é importante também

lançar mão de técnicas moleculares para sua identificação, com o propósito de evitar subestimar a população presente na amostra (STREIT & SCHMITZ, 2004).

Neste trabalho foram identificadas a microbiota presente na rizosfera de plantas de tomate cultivadas no SMS de cogumelos das espécies *Agaricus subrufescens* e *Agaricus bisporus*, crescidos ou não de substrato comercial e comparados com o substrato comercial (Tropstrato).

2. MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de SMS das duas espécies de *Agaricus* foram trituradas em partículas menores, visando a uma melhor textura do substrato para a produção de mudas.

As sementes de tomate (*Solanum esculentum*), cultivar Santa Cruz Kada, foram germinadas em bandeja de isopor, preenchidas com substrato comercial (Tropstrato®) para hortaliças e submetidas à irrigação duas vezes ao dia. Após 17 dias de semeadura, foram transplantadas mudas para vasos de 1,5 litros, contendo os substratos à base de SMS e controle.

O SMS dos cogumelos *Agaricus* foi utilizado para compor o substrato para transplântio das mudas de tomateiro, nas proporções de 50% ou 100%, além do controle (100% Substrato Comercial [Tropstrato]). Tabela 1).

Tabela 1 - Tratamentos referentes aos substratos utilizados para o transplântio das mudas de tomateiro. AS100: 100% *A. subrufescens*; AS50: 50% *A. subrufescens*+50% Tropstrato®; AB100: 100% *A. bisporus*; AB50: 50% *A. bisporus*+50% Tropstrato®; Controle: 100% Tropstrato®

Tratamento/Código	Semana 1	Semana 4	Semana 8	Semana 9	Semana 11
AS100	AS100 1	AS100 4	AS100 8	AS100 9	AS100 11
AS50	AS50 1	AS50 4	AS50 8	AS50 9	AS50 11
AB100	AB100 1	AB100 4	AB100 8	AB100 9	AB100 11
AB50	AB50 1	AB50 4	AB50 8	AB50 9	AB50 11
Controle	C 1	C 4	C 8	C 9	C 11

Amostras de solo rizosférico foram coletadas, uma vez por semana, durante onze semanas. Destas, foram escolhidas amostras das semanas 1, 4, 8, 9 e 11. Seu DNA foi extraído com uso do Power Soil® DNA Isolation Kit (MoBio) seguindo as instruções do fabricante. Para as reações de amplificação

do DNA de procariotos, foram utilizados os primers 338f e 518r GC. Para eucariotos foram utilizados os primers ITS1 e ITS2 GC.

Os produtos de PCR foram aplicados em gel de poliacrilamida a 8%, com gradiente desnaturante de 35 a 50% para procariotos e 8 a 45% para eucariotos. A eletroforese foi realizada em uma unidade de DGGE D-Code e as bandas mais proeminentes foram amplificadas por PCR para posterior identificação das espécies, através de sequenciamento da região ribossomal. O sequenciamento dos amplicons foi realizado na Macrogen USA (Rockville, Maryland, USA) e as seqüências foram comparadas com a base de dados do GenBank.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O composto orgânico é conhecido há bastante tempo por apresentar uma característica de supressividade contra patógenos, em especial do solo, associada à presença de diferentes compostos químicos, e também à uma ação direta dos microrganismos presentes nele (SUÁREZ-ESTRELLA et al., 2013).

A análise por DGGE revelou uma maior diversidade de procariotos em relação a eucariotos, tanto nas amostras oriundas do substrato comercial como dos substratos à base de SMS dos cogumelos *Agaricus* (Figuras 1 e 2).

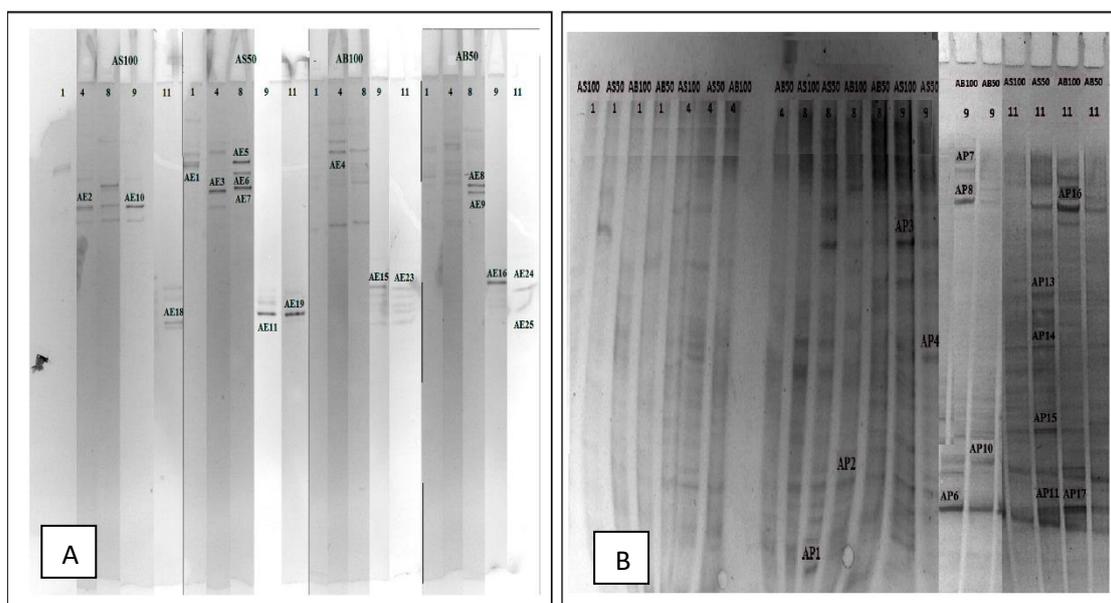


Figura 1 - Padrão de bandas de DGGE da região da rizosfera em plantas de tomate cultivadas em compostos pós-cultivo de cogumelos das espécies *Agaricus subrufescens* e *Agaricus bisporus*, acrescidos ou não de substrato comercial (Tropstrato), nas semanas 1, 4, 8, 9 e 11. AS100 (100% *A. subrufescens*), AS50 (50% *A. subrufescens*+50% Tropstrato), AB100 (100% *A. bisporus*), AB50 (50% *A. bisporus*+50% Tropstrato), para eucariotos (A) e procariotos (B).

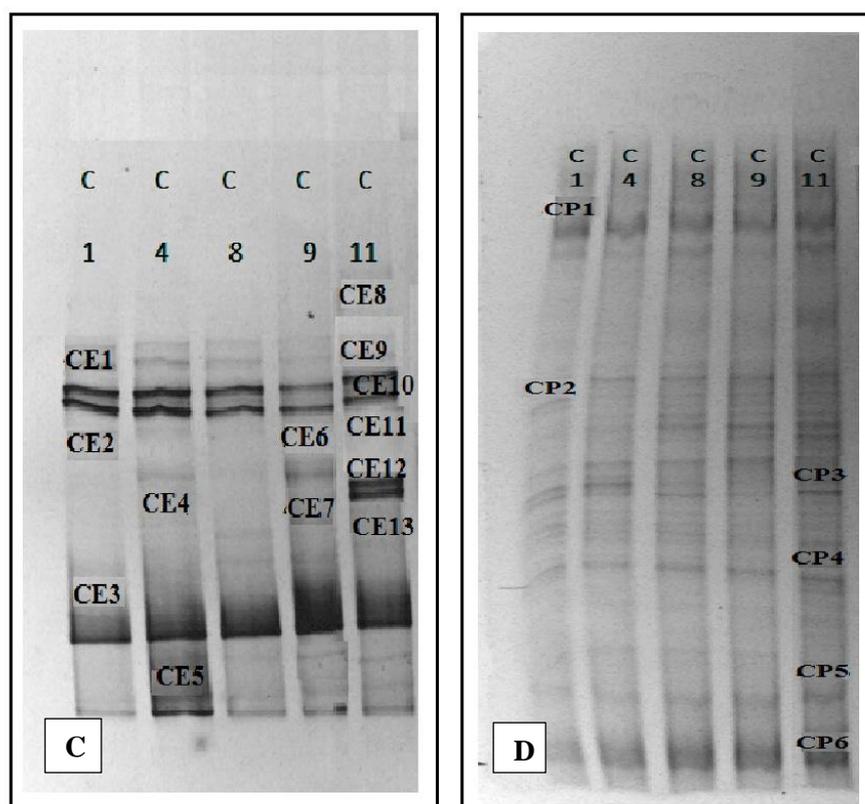


Figura 2 - Padrão de bandas de DGGE da região da rizosfera de plantas de tomate cultivadas em substrato comercial (Tropstrato), ao longo das semanas 1, 4, 8, 9 e 11. C (100% substrato comercial [Tropstrato]), para eucariotos (C) e procariotos (D).

Chaetomium globosum e *Arthrobotrys amerospora* foram as espécies predominantes dentre as amostras sequenciadas de eucariotos, oriundas da rizosfera de mudas obtidas em substrato à base de SMS de *A. subrufescens* (Tabela 2).

Tabela 2 - Identidade de nucleotídeos utilizando banco de dados Blast (ncbi) das sequências recuperadas das bandas do DGGE para eucariotos e procariotos. Amostra de SMS de *Agaricus*.

Nome da amostra	Banda	Nome	Similaridade (%)	Número de acesso	Nome da amostra	Banda	Nome	Similaridade (%)	Número de acesso
AS100 4	AE2	<i>Chaetomium globosum</i>	100	JX981455.1	AS50 8	AP1	Bactéria não cultivável clone GCSTWT	91	KT776584.1
AS100 9	AE10	<i>Chaetomium globosum</i>	99	JX981455.1					
AS100 11	AE18	<i>Arthrobotrys amerospora</i>	100	AF106533.1	AS509	AP4	Bactéria não cultivável clone Feb08	96	GU117216.2
AS50 4	AE 3	<i>Chaetomium globosum</i>	100	AB449671.1	AS50 11	AP11	Alfa proteobactéria não cultivável EDay154M2-CL47	95	LC017178.1
	AE7	<i>Arthrobotrys amerospora</i>	99	AF106533.1		AP13	Bactéria não cultivável clone B035	99	JX967611.1
AS50 9	AE11	<i>Arthrobotrys amerospora</i>	100	AF106533.1		AP15	Bactéria não cultivável clone PB17012-2 C02	88	JX172031.1
AS50 11	AE19	<i>Arthrobotrys amerospora</i>	100	AF106533.1	AB100 9	AP6	Alfa proteobactéria não cultivável EDay154M2-CL47	97	LC017178.1
AB100 4	AE4	<i>Geastrum floriforme</i>	99	KC581984.1		AP8	Bactéria não cultivável clone OTU8704	97	KT791607.1
AB100 11	AE23	<i>Olpidium brassicae</i>	100	AB205207.1	AB100 11	AP17	<i>Actinoplanes</i> sp.	84	EU547834.1
AB50 8	AE8	<i>Pleurotus ostreatus</i>	100	AY540325.1					
	AE9	<i>Pleurotus sapidus</i>	100	FJ1081.1					
AB50 11	AE24	<i>Geastrum floriforme</i>	94	KC581984.1					
	AE25	<i>Chrysosporium Chiropterorum</i>	87	AM949570.1					
EUCARIOTOS					PROCARIOTOS				

Não foram identificados os eucariotos: AE1, AE5, AE6, AE15 e AE16.

Não foram identificados os procariotos: AP3, AP14, AP2, AP7, AP16, AP10

Chaetomium globosum é um fungo bastante abundante na natureza, e produz metabólitos que podem agir no biocontrole contra patógenos. Wang et al. (2012) encontraram nesse microrganismo compostos como ergosterol e

chaetoglobosina X, que possuem atividade antifúngica. Hu et al. (2012) observaram atividade nematicida da substância chaetoglobosina A, produzida pelo fungo.

Arthrobotrys amerospora é um fungo nematófago que possui a capacidade de capturar nematoides e outros pequenos invertebrados no solo, sendo conhecido como fungo predador (ZANG et al., 2013a). É uma característica desejável na agricultura, já que muitas espécies de nematoides são parasitas de plantas e podem causar grandes perdas.

Para o SMS de *A. bisporus*, dentre as espécies de fungos identificadas por sequenciamento (Tabela 2), destaca-se o fitopatógeno *Olpidium brassicae*, conhecido como um fungo presente no solo, que infecta raízes de plantas, podendo ser encontrado em resíduos orgânicos utilizados na agricultura (MIKKELSEN et al., 2006).

Outra espécie identificada foi *Geastrum floriforme* (Tabela 2), que pertence a um gênero bastante diverso, com ampla gama de habitats. Essa espécie foi relatada pela primeira vez no Brasil por Sousa et al. (2014). Uma descoberta tão tardia no Brasil é, provavelmente, decorrente do fato dessa espécie não apresentar riscos para a agricultura. *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus sapidus* foram também encontrados na rizosfera das mudas produzidas em substrato com SMS de *A. bisporus* (Tabela 2). *Pleurotus* é um dos gêneros mais diversos de cogumelos cultivados, com algumas espécies capazes de produzir nematotoxinas, secretadas pelas hifas, que imobilizam nematoides (COHEN et al., 2002; SILVA, 2014). Marino e Silva (2013) mostraram a redução de nematoides da espécie *Meloidogyne incognita* em plantas de alface por *P. ostreatus* inoculados nas raízes da planta, comprovando a capacidade dessa espécie no controle de nematoides.

O gênero *Chrisosporium* está normalmente presente no solo, atuando como saprófita com ampla distribuição, sendo um produtor de metabólitos, como enzimas e antimicrobianos, alguns são o queratinofílicos, termotolerantes e algumas espécies podem causar infecções de pele em humanos (LIU; PATERSON, 2011; ZHANG et al., 2013a).

Para as amostras obtidas do SMS 100% de *A. subrufescens*, o perfil de bandas de procariotos mostrou-se constante ao longo do tempo (Figura 1 - B). Algumas das espécies encontradas já foram relatadas, tendo as suas sequências depositadas, sem, entretanto, uma identificação das mesmas (Tabela 2). Segundo Jackson e Denney (2011), o microrganismo identificado como bactéria não cultivável clone Feb08 pertence ao filo actinobactéria, assim como bactéria não cultivável clone PB17012-2 C02 (BAJERSKI; WAGNER, 2013).

Nas amostras da região da rizosfera de mudas de tomate cultivada em composto de 100% *Agaricus bisporus*, observa-se padrão semelhante entre todas as semanas analisadas (Figura 1-B). As sequências encontradas apresentaram semelhanças com: Bactéria não cultivável clone OTU8704, alfa proteobactéria não cultivável EDay154M2-CL47 e *Actinoplanes* sp. (Tabela 2).

Actinoplanes é um gênero pertencente ao filo actinobactéria, também citado anteriormente. Algumas espécies do gênero apresentam forte atividade antibacteriana (WINK et al., 2014). O filo actinobactéria está entre os maiores filios de bactérias, e é distribuído tanto em ambientes aquáticos quanto terrestres. São comumente encontradas em compostos para cultivo de cogumelos, pois o processo de compostagem favorece seu crescimento. Podem apresentar benefícios à planta e, por isso, é desejável que se reaproveite o composto, já que estas provavelmente estarão presentes.

Na região da rizosfera de tomateiros cultivados em substrato comercial, foram encontradas as espécies: *Candida mesorugosa*, *Trichosporon* sp., *Arthrobotrys amerospora*, *Trichosporon mycotoxinovorans* e *Trichosporon asahii*, além de uma micorriza não cultivável da ordem Sebaciales (Tabela 3).

Tabela 3 - Identidade de nucleotídeos utilizando banco de dados Blast (ncbi) das sequências recuperadas das bandas do DGGE para eucariotos e procariotos. Amostras de substrato comercial (Tropstrato).

Nome da amostra	Banda	Nome	Similaridade (%)	Número de acesso	Nome da amostra	Banda	Nome	Similaridade (%)	Número de acesso
C 1	CE1	<i>Trichosporon</i> sp.	100	KT033396.1	C 1	CP2	Bactéria não cultivável BUJIT6	95	EU133567.1
	CE2	<i>Trichosporon</i> sp	100	KT033396.1	C 11	CP4	Acidobactéria não cultivável clone EDay84M2C L44	96	LC017664.1
	CE3	<i>Candida mesorugosa</i>	94	KM382432.1		CP5	<i>Aeromicrobium</i> sp.	90	KF718657.1
C 4	CE4	<i>Arthrotrrys amerospora</i>	92	AF106533.1	CP6	<i>Caulobacter</i> sp.	95	LC011372.1	
	CE5	<i>Trichosporon micotoxinivorans</i>	99	KT132613.1					
C 11	CE8	<i>Trichosporon asahii</i>	100	KT282395.1					
	CE10	<i>Trichosporon micotoxinivorans</i>	100	KT132613.1					
	CE11	<i>Trichosporon micotoxinivorans</i>	100	KT132613.1					
	CE12	<i>Conocybe nigrescens</i>	93	JX968234.1					
	CE13	Micorriza não cultivável (Sebacinales)	87	EU625972.1					
EUCARIOTOS					PROCARIOTOS				

Não foram identificados os eucariotos: CE6, CE7 e CE9.

Não foram identificados os procariotos: CP1 e CP3.

Candida mesorugosa é uma levedura normalmente encontrada em amostras ambientais, que foi recentemente classificada como causadora de infecções em humanos (CHAVES et al, 2013). Não foram encontrados trabalhos acerca de sua associação com tomateiro ou com SMS.

Trichosporon mycotoxinovorans é uma levedura que tem como característica a capacidade de eliminar micotoxinas, tais como ocratoxina A e zearalenona.

El-Tarabily (2004) mostrou que *Trichosporon asahii* produz IAA (índole-3-acetic acid) e GA3 (ácido giberélico), que podem melhorar o crescimento de plantas.

Segundo Bokati e Craven (2016), à ordem Sebaciales pertencem fungos micorrízicos, que estão presentes na maior parte dos ecossistemas e se associam a um grande número de plantas hospedeiras, porém, pouco é sabido a respeito de seu papel nessas comunidades.

Para as amostras de procariotos na região da rizosfera de tomateiros cultivados no substrato comercial (Tropstrato), foram encontrados: Bactéria não cultivável BUJIT6, Acidobactéria não cultivável clone EDay84M2CL44, *Aeromicrobium* sp e *Caulobacter* sp. (Tabela 3).

A bactéria não cultivável BUJIT6 foi isolada de solo (ELSHAHED et al., 2008), assim como acidobactéria não cultivável clone EDay84M2CL44 (KATO et al., 2015). Acidobacteria é um filo recentemente descrito (meados dos anos 90), que possui representantes diversos, adaptados às mais diversas características ambientais. Espécies do gênero *Aeromicrobium* produzem antibióticos da classe dos macrolídeos e crescem em ambientes ricos em nitrogênio, (BOMFIM, 2010; SHANG; YI, 2015).

A bactéria identificada como não cultivável clone EDay154M2-CL47 pertence às alfa proteobactérias, pertencentes ao filo proteobactéria, que inclui gêneros fototróficos, agentes patogênicos e os simbioses de plantas, além de abrigar espécies conhecidas como promotoras de crescimento em plantas (MADIGAN et al., 2012). Não foi possível encontrar informações sobre alguns organismos identificados. Apesar de não identificados, esses microrganismos podem desempenhar papéis importantes na relação com a planta. Por isso, seria interessante realizar estudos mais profundos a respeito deles a fim de identificá-los.

Os resultados de grupos bacterianos identificados neste trabalho assemelharam-se aos encontrados por Ntougias et al. (2004), que também identificaram bactérias pertencentes às divisões Proteobactéria e Actinobactéria no SMS de cogumelos agaricáceos. Entretanto, nenhuma das espécies encontradas por aqueles autores foi detectada no presente estudo. Pode-se atribuir a esse fato possíveis diferenças entre matérias-primas específicas utilizadas para a produção do substrato do cogumelo e as suas condições ambientais, que podem influenciar significativamente a natureza da população bacteriana a colonizar o SMC.

Considerando o nicho ecológico, pode-se dizer que grande parte dos microrganismos identificados no presente trabalho possuem origem ambiental, ou seja, vivem em solos, na região da rizosfera, associados a plantas e na água.

CONCLUSÃO

Diferentes espécies de microrganismos foram diagnosticadas na rizosfera de mudas de tomateiro produzidas no SMS de cogumelos *A. bisporus* e *A. subrufescens*. Dentre essas espécies, algumas são conhecidas como microrganismos benéficos, atuando no controle biológico de nematoides e doenças do sistema radicular. Entretanto, espécies de fitopatógenos foram também diagnosticadas na rizosfera das mudas produzidas no SMS de *A. bisporus*. Portanto, apesar do seu grande potencial como substrato para a produção de mudas, esse coproduto da cadeia de produção de cogumelos no Brasil ainda precisa de um manejo mais adequado para garantir a sua segurança fitossanitária.

REFERÊNCIAS

BAJERSKI, F.; WAGNER, D. Bacterial succession in Antarctic soils of two glacier forefields on Larsemann Hills, East Antarctica. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 85, n. 1, p. 128-142, July 2013.

BAS, C. A short introduction to the ecology, taxonomy and nomenclature of the genus *Agaricus*. **Mushroom Science**, Amsterdam, v. 15, n. 1, p. 25-39, 1991.

BOKATI, D.; CRAVEN, K. D. The cryptic Sebacinales: an obscure but ubiquitous group of root symbionts comes to light. **Fungal Ecology**, Amsterdam, v. 22, p. 115-119, Aug. 2016.

BOMFIM, G. F. **Atividade antimicrobiana de microrganismos isolados de cupinzeiros da região da mata de cipó, Bahia**. 2010. 70 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, 2010.

CARRIJO, O. A. et al. Produtividade do tomateiro em diferentes substratos e modelos de casas de vegetação. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 5-9, jan./mar. 2004.

CHAVES, G. M. et al. *Candida mesorugosa* sp. nov., a novel yeast species similar to *Candida rugosa*, isolated from a tertiary hospital in Brazil. **Medical Mycology**, Oxford, v. 51, n. 3, p. 231-242, Aug. 2013.

COHEN, R. et al. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 58, n. 5, p. 582-594, Apr. 2002.

ELSHAHED, M. S. et al. Novelty and uniqueness patterns of rare members of the soil biosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 17, p. 5422-5428, Sept. 2008.

EL-TARABILY, K. A. Suppression of *Rhizoctonia solani* diseases of sugar beet by antagonistic and plant growth-promoting yeasts. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 96, n. 1, p. 69-75, 2004.

HU, Y. et al. Nematicidal activity of chaetoglobosin A produced by *Chaetomium globosum* NK102 against *Meloidogyne incognita*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 61, n. 1, p. 41-46, Jan. 2012.

- JACKSON, C. R.; DENNEY, W. C. Annual and seasonal variation in the phyllosphere bacterial community associated with leaves of the southern magnolia (*Magnolia grandiflora*). **Microbial Ecology**, New York, v. 61, n. 1, p. 113-122, Jan. 2011.
- KATO, H. et al. Time-series metagenomic analysis reveals robustness of soil microbiome against chemical disturbance. **DNA Research**, Oxford, v. 22, n. 6, p. 413-424, Oct. 2015.
- LIU, D.; PATERSON, R. R. M. Emmonsia. In: LIU, D. **Molecular Detection of Human Fungal Pathogens**. Boca Raton: CRC Press, 2011. p. 235-240.
- LOPES, R. X. et al. Application of spent *Agaricus subrufescens* compost in integrated production of seedlings and plants of tomato. **International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture**, Tehran, v. 4, n. 3, p. 211-218, Sept. 2015.
- MADIGAN M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. Porto Alegre: Artmed, 2012. 1160 p.
- MARINO, R. H.; SILVA, D. G. C., Controle de nematóide de galhas por *Pleurotus ostreatus*. **Scientia Plena**, Piracicaba, v. 9, n. 10, p. 1-6, 2013.
- MIKKELSEN, L. et al. **Literature review on detection and eradication of plant pathogens in sludge, soil and treated biowaste; desk study on bulk density**. Bruxelles: The European Commission DG RTD under the Framework 6 Programme, 2006.
- NTOUGIAS, S. et al. Bacterial diversity in spent mushroom compost assessed by amplified rDNA restriction analysis and sequencing of cultivated isolates. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 27, n. 6, p. 746-754, Nov. 2004.
- PARK, J. et al. Antifungal activity against plant pathogenic fungi of chaetoviridins isolated from *Chaetomium globosum*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 252, n. 2, p. 309-313, Nov. 2005.
- RINKER, D. L. Handling and using “spent” mushroom substrate around the world. In: WORLD SOCIETY FOR MUSHROOM BIOLOGY AND MUSHROOM PRODUCTS. **Mushroom biology and mushroom products**. Cuernavaca: Universidad Autónoma del Estado de Morelos, 2002. p. 43-60.

SHANG, S.; YI, Y. A greenhouse assay on the effect of applied urea amount on the rhizospheric soil bacterial communities. **Indian Journal of Microbiology**, Calcutta, v. 55, n. 4, p. 406-414, Dec. 2015.

SILVA, M. E. **Controle biológico de nematoides gastrintestinais em bovinos: avaliação da eficácia dos fungos predadores *Duddingtonia flagrans* e *Monacrosporium thaumasium* produzidos em sistema bifásico e formulados em matriz de alginato de sódio**. 2014. 133 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

SOUSA, J. O. et al. Updates on the geographic distribution of three Geastrum species from Brazilian semi-arid region. **Mycosphere**, Essex, v. 5, n. 3, p. 467-474, 2014.

SOUSA, M. N. **Avaliação do uso do composto clássico na produção de cogumelos (*Agaricus*)**. 2012. 25 p. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Engenharia Ambiental) - Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2012.

STREIT, W. R.; SCHMITZ, R. A. Metagenomics—the key to the uncultured microbes. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 7, n. 5, p. 492-498, Oct. 2004.

SUAREZ-ESTRELLA, F. et al. Biological control of plant pathogens by microorganisms isolated from agro-industrial composts. **Biological Control**, Orlando, v. 67, n. 3, p. 509-515, Dec. 2013.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS. Biblioteca Universitária. **Manual de normalização e estrutura de trabalhos acadêmicos: TCCs, monografias, dissertações e teses**. 2. ed. rev., atual. e ampl. Lavras: Editora da UFLA, 2016. Disponível em: <<http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/11017>>. Acesso em: 06 jul. 2016.

WANG, Y. et al. Bioactive metabolites from *Chaetomium globosum* L18, an endophytic fungus in the medicinal plant *Curcuma wenyujin*. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 19, n. 3/4, p. 364-368, Feb. 2012.

WINK, J. et al. Emended description of *Actinoplanes friuliensis* and description of *Actinoplanes nipponensis* sp. nov., antibiotic-producing species of the genus *Actinoplanes*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 64, n. 2, p. 599-606, Feb. 2014.

ZANG, Y. et al. Genetic diversity and recombination in natural populations of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora* from China.

Ecology and Evolution, Oxford, v. 3, n. 2, p. 312-325, Feb. 2013a.

ZHANG, Y. W. et al. A new species of the genus *Chrysosporium* from the rhizosphere soil of palm. **Mycosystema**, Oxford, v. 32, n. 4, p. 612-616, 2013b.