



PETERSON SYLVIO DE OLIVEIRA NUNES

Bacillus subtilis E *Bacillus licheniformis* NA PROMOÇÃO DE
CRESCIMENTO E NO CONTROLE DA MURCHA DE
FUSARIUM NO TOMATEIRO

**LAVRAS-MG
2020**

PETERSON SYLVIO DE OLIVEIRA NUNES

Bacillus subtilis E *Bacillus licheniformis* NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E NO
CONTROLE DA MURCHA DE FUSARIUM NO TOMATEIRO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em
Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em
Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

Dr. Wagner Bettiol
Orientador

Dr. Flavio Henrique Vasconcelos de Medeiros
Coorientador

**LAVRAS-MG
2020**

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

Nunes, Peterson Sylvio de Oliveira.

Bacillus subtilis E *Bacillus licheniformis* na promoção de crescimento e no controle da murcha de *Fusarium* no tomateiro / Peterson Sylvio de Oliveira Nunes. - 2020.

62p.

Orientador (a): Wagner Bettiol.

Coorientador: Flavio Henrique Vasconcelos de Medeiros.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. *Bacillus*. 2. Promoção de crescimento. 3. Controle biológico I. Bettiol, Wagner. II. Flavio Henrique Vasconcelos de Medeiros. III. Título.

PETERSON SYLVIO DE OLIVEIRA NUNES

Bacillus subtilis E *Bacillus licheniformis* NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E NO
CONTROLE DA MURCHA DE FUSARIUM NO TOMATEIRO

Bacillus subtilis AND *Bacillus licheniformis* IN THE GROWTH PROMOTION AND IN
THE CONTROL OF TOMATO FUSARIUM WILT

Dissertação apresentada à Universidade Federal de
Lavras, como parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de
concentração em Fitopatologia, para obtenção do
título de Mestre.

APROVADA em 11 de Fevereiro de 2020

| | |
|---|-----------------------|
| Dr. Wagner Bettiol | Embrapa Meio Ambiente |
| Dra. Kátia de Lima Nechet | Embrapa Meio Ambiente |
| Dr. Gileno Vieira Lacerda Júnior | Embrapa Meio Ambiente |
| Dr. Flavio Henrique Vasconcelos de Medeiros | UFLA |

Dr. Wagner Bettiol
Orientador

Dr. Flavio Henrique Vasconcelos de Medeiros
Coorientador

**LAVRAS-MG
2020**

À minha mãe Ana Maria de Oliveira
Nunes, pelo apoio, confiança, dedicação e
carinho em todas as etapas e por ser
exemplo de luta e de vida.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Fitopatologia e todos seus funcionários, pela oportunidade e aprendizado.

Ao Prof. Dr. Wagner Bettiol, pela orientação, apoio, confiança, paciência, ajuda, dedicação, incentivo e pelos conhecimentos transmitidos.

Ao Prof. Dr. Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros, pela coorientação, suporte e ensinamentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão de bolsa de estudos e recursos para execução do projeto.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Meio Ambiente, pela oportunidade e apoio concedidos para meu aperfeiçoamento pessoal e profissional.

À Empresa Chr. Hansen, pela colaboração no desenvolvimento dos estudos.

Aos meus familiares, em especial à minha mãe e as minhas irmãs, por todo apoio, confiança e incentivo.

À secretária da pós-graduação Ariane, pelos aconselhamentos, amizade e por toda ajuda e colaboração.

Aos funcionários da Embrapa Meio Ambiente: Neusa Domingos, Anamaria Dentzien, Rosely Nascimento, Ana Carolina, Celia Lima, Henrique Vieira, Júlio Oliveira, Antônio Souza, Gabriel Mascarin e Elke Vilela, pela colaboração e amizade.

Aos amigos, Arthur Isaac, Carla Teixeira, David Barreiros, David Resende, Debora Almeida, Diego Dornelas, Evandro Freitas, Filipe Sales, Gabriel Moreira, Gabriel Ortolani, Gabriel Oliveira, Gustavo Guimarães, Leonardo Teixeira, Gustavo Carvalho, Matheus Carvalho, Priscila Milagres, Rafaela Balisa, Vitor Oliveira e Vanessa Godoi, pela amizade e companheirismo de sempre.

Aos amigos do Departamento de Fitopatologia e da Embrapa Meio Ambiente: Abilene Pego, David Duarte, Gileno Lacerda, Fernanda Godoy, João Ventura, Laura Bononi, Laís Duré, Leonardo Silva, Lilian Abreu, Lucas Guedes, Nelson Maganhoto, Marina Pacífico, Marta Moitinho e Mirian Rabelo, que tornaram essa caminhada mais fácil.

Enfim, agradeço a todos que tornaram esse sonho possível.

MUITO OBRIGADO!

RESUMO

Diversos problemas fitossanitários ocorrem nas plantas de tomate e uma das doenças que causa prejuízo é a murcha de Fusarium, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL), a qual pode acarretar perdas de até 100% na produção, sendo considerada de difícil controle. Embora o uso de cultivares resistentes seja o melhor método de controle da doença, a ocorrência de novas raças agressivas do patógeno tem sido um desafio para os agricultores. O controle biológico pode ser uma alternativa eficaz e promissora para o seu manejo, quando do plantio de variedades susceptíveis ao patógeno. O presente trabalho teve como objetivos avaliar a eficiência de *Bacillus subtilis* e de *Bacillus licheniformis*, isoladamente ou em mistura, em promover o crescimento e em controlar a murcha de Fusarium, causada por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3 em tomateiro. Para avaliar a promoção de crescimento em tomateiros, a mistura de *B. subtilis* e *B. licheniformis* (Quartzo[®]) foi aplicada nas concentrações de 1×10^8 , 1×10^9 e 1×10^{10} UFC mL⁻¹, bem como a aplicação da suspensão de células separadamente na concentração 1×10^8 UFC mL⁻¹. O estudo foi conduzido em rizotrons (100 cm x 17,5 cm) em delineamento inteiramente casualizado. A altura da planta (cm), o diâmetro da base da haste (mm), as massas frescas e secas da parte aérea e do sistema radicular (g), o volume (mL) e o comprimento das raízes (cm) foram avaliados. Para o controle da murcha de Fusarium, os estudos foram conduzidos em vasos plásticos e em delineamento em blocos casualizados. Para isso, mudas de tomateiro foram transplantadas para vasos contendo substrato infestado com FOL (2×10^5 clamidósporos g⁻¹ de substrato), sendo que esses estudos foram divididos em duas partes. Na primeira parte, avaliou a aplicação da mistura de *B. subtilis* e de *B. licheniformis* na concentração de 1×10^{10} UFC mL⁻¹ e na segunda parte os isolados de *Bacillus* foram aplicados separadamente na concentração de 1×10^8 UFC mL⁻¹. A altura das plantas (cm), o diâmetro das hastes (mm), as massas frescas e secas da parte aérea e do sistema radicular (g) e os sintomas internos e externos da doença foram avaliados. Os isolados de *Bacillus*, aplicados em mistura ou isoladamente, promoveram o crescimento das plantas, especialmente o das raízes. A aplicação da mistura dos isolados não foi efetiva no controle da murcha de Fusarium. Entretanto, a aplicação dos isolados separadamente reduziu os sintomas da doença, permitindo maior desenvolvimento das plantas tratadas. Também a aplicação da mistura na concentração de 1×10^8 UFC mL⁻¹ reduziu a severidade da doença. Os isolados de *B. subtilis* e de *B. licheniformis* foram detectados tanto na rizosfera quanto na seiva das plantas tratadas. A aplicação dos isolados de *B. subtilis* e *B. licheniformis*, em mistura ou separadamente, em substrato livre do patógeno, foi eficiente na promoção de crescimento das plantas de tomate.

Palavras chave: *Bacillus*, Promoção de crescimento, Controle biológico

ABSTRACT

Tomato plants are affected by several pests and diseases, including tomato Fusarium wilt, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL), which is considered as one of the most destructive vascular disease of tomato. Tomato Fusarium wilt can cause serious economic losses (up to 100% in production), being considered difficult to control. Although resistant cultivars provide the best method to manage tomato Fusarium wilt, the occurrence of new aggressive races of the pathogen has been a challenge for producers. Biological control may be an effective and promising alternative for management when planting varieties susceptible to the pathogen. The objectives of this study were to evaluate the effects of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*, alone or in mixture, to promote plant growth and in the control of tomato Fusarium wilt caused by *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3. The ability of mixture of *B. subtilis* and *B. licheniformis* (Quartzo[®]) strains to promote the growth of tomato plants was evaluated in plastic pots applying 1×10^8 , 1×10^9 and 1×10^{10} CFU mL⁻¹, as well as applying cell suspension of *B. subtilis* and *B. licheniformis*, in mixture and separately, at 1×10^8 CFU mL⁻¹ concentration in plants developed in rizotrons (100 cm x 17.5 cm). Plant height (cm), stem base diameter (mm), root and shoot fresh and dry mass (g) and root volume (mL) and length (cm) were evaluated. To evaluate the effect of *B. subtilis* and *B. licheniformis* in the control of Fusarium wilt, tomato seedlings were transplanted into substrate infested with FOL (2×10^5 chlamydospores g⁻¹ substrate). These studies were divided into two parts, in the first part was evaluated the application of the mixture of *B. subtilis* and *B. licheniformis* in the concentration of 1×10^{10} CFU mL⁻¹, and in the second part, the *Bacillus* were applied separately in the concentration of 1×10^8 CFU mL⁻¹. Plant height (cm), stem base diameter (mm), root and shoot fresh and dry mass (g), and the severity disease (internal and external symptoms) were evaluated. *Bacillus* isolates, applied in mixture or separately, promote plant growth, especially the roots. The mixture of the isolates was not effective in controlling tomato Fusarium wilt. However, the application of the strains separately, reduces the symptoms of the disease and allows greater growth of the treated plants. Also, the application of the mixture at a concentration of 1×10^8 CFU mL⁻¹ reduces the severity of the disease. *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* isolates were detected both in the rhizosphere and in the sap of the treated plants. The application of *B. subtilis* and *B. licheniformis* isolates, in mixture or separately, in substrate without the pathogen, was efficient to promote plant growth of tomato plants.

Key words: *Bacillus*, Growth Promotion, Biological Control

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Porcentagem de germinação após cinco (A) e oito (B) dias após semente e protrusão (três dias após semente) da radícula (C) de sementes de tomate tratadas com a mistura de *Bacillus subtilis* e de *Bacillus licheniformis* (Quartzo[®]).
- Figura 2** Germinação, crescimento do sistema radicular e formação de pelos radiculares de plântulas de tomate originárias de sementes tratadas com mistura de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (Quartzo[®]) na concentração de 1×10^{10} UFC mL⁻¹.
- Figura 3** Efeito do tratamento de semente de tomate com a mistura de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (Quartzo[®]) nas concentrações de 0, 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 e 1×10^{10} UFC mL⁻¹ nas massas secas e frescas da parte aérea e do sistema radicular das plântulas.
- Figura 4** Colônias de bactérias isoladas da seiva exsudada após o corte transversal da haste principal de tomateiro obtidos de diferentes formas e épocas de aplicação da mistura contendo de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (Quartzo[®]) na concentração 1×10^{10} UFC mL⁻¹. A- controle com água; B - aplicação da mistura de *Bacillus* no substrato de semente; C - aplicação da mistura de *Bacillus* nas sementes; D - aplicação da mistura de *Bacillus* no substrato de semente e nas sementes; E - aplicação da mistura de *Bacillus* sete dias após o transplante (DAT); F - aplicação da mistura de *Bacillus* no substrato de semente e sete DAT; G - aplicação da mistura de *Bacillus* nas sementes e no substrato sete DAT; H - aplicação da mistura de *Bacillus* no substrato de transplante; I - aplicação da mistura de *Bacillus* no substrato de semente e no substrato de transplante; J - aplicação da mistura de *Bacillus* nas sementes e no substrato de transplante; K - aplicação da mistura de *Bacillus* no substrato de semente, nas sementes, substrato de transplante e sete DAT.
- Figura 5** Colônias de bactérias isoladas da haste principal de tomateiro com diferentes formas e épocas de aplicação da mistura de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (Quartzo[®]) na concentração 1×10^{10} UFC mL⁻¹. A- controle com

água; B - aplicação da mistura de *Bacillus* no substrato de semeadura; C - aplicação da mistura de *Bacillus* nas sementes; D - aplicação da mistura de *Bacillus* no substrato de semeadura e nas sementes; E - aplicação da mistura de *Bacillus* sete dias após o transplante (DAT); F - aplicação da mistura de *Bacillus* no substrato de semeadura e sete DAT; G - aplicação da mistura de *Bacillus* nas sementes e no substrato sete DAT; H - aplicação da mistura de *Bacillus* no substrato de transplante; I - aplicação da mistura de *Bacillus* no substrato de semeadura e no substrato de transplante; J - aplicação da mistura de *Bacillus* nas sementes e no substrato de transplante; K - aplicação da mistura de *Bacillus* no substrato de semeadura, nas sementes, substrato de transplante e sete DAT.

Figura 6 Volume da raiz (A), comprimento da raiz (B), massas fresca (C) e seca (D) do sistema radicular e massa seca da parte aérea (E) de plantas tomate tratadas com a mistura de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (Quartzo[®]) nas concentrações de 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} UFC mL⁻¹; com *B. subtilis* (BS) e *B. licheniformis* (BL), separadamente, na concentração de 1×10^8 UFC mL⁻¹ e controle (CA) desenvolvidas em rizotrons. Medias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott- Knott, 5 % de probabilidade. Barras de erros representam o desvio padrão.

Figura 7 Tomateiros desenvolvidas em rizotron originários de plantas tratadas com a mistura de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (Quartzo[®]) nas concentrações 0, 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} UFC mL⁻¹, *B. subtilis* (BS) e *B. licheniformis* (BL), separadamente, na concentração de 1×10^8 UFC mL⁻¹ e controle (CA).

Figura 8 Massa fresca e seca da parte aérea (A) e do sistema radicular (B) de plantas de tomate cultivadas em solo infestado com *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3 (FOL), submetidas à aplicação da mistura de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*, na concentração de 1×10^{10} UFC mL⁻¹, nas mudas (M); no substrato de transplantio (S); nas mudas e no substrato de transplantio (MS); nas mudas, no substrato de transplantio e 10 dias após o transplante (MS10) e aplicação nas mudas, no substrato de transplantio e 10 e 20 dias após o transplante (MS1020). Medias seguidas de mesma letra não

diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, 5 % de probabilidade. Barras de erros representam o desvio padrão.

Figura 9 Planta com sintoma externo da murcha de Fusarium (A), haste com sintoma interno da murcha de Fusarium (B), colônias de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* obtida a partir de fragmentos da haste de plantas de tomate cultivadas em solo infestado com o patógeno e tratadas com aplicação da mistura de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* na concentração de 1×10^{10} UFC mL⁻¹ (C), macro e microconídios de *Fusarium* (D).

Figura 10 Efeito da aplicação nas mudas e no substrato de transplante da mistura contendo *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (Quartzo[®]) nas concentrações de 0, 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 e 1×10^{10} UFC mL⁻¹ sobre a severidade interna da murcha de Fusarium de tomateiro cultivados em solo infestado com *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3.

Figura 11 Efeito da aplicação nas mudas e no substrato de transplante da mistura contendo *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (Quartzo[®]) (BS + BL) e dos isolados de *B. subtilis* (BS) e de *B. licheniformis* (BS), separadamente, na concentração de 1×10^8 UFC mL⁻¹ sobre a severidade interna da murcha de Fusarium de tomateiro cultivados em solo infestado com *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Efeito das formas e momento de aplicação da mistura de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*, na concentração 1×10^9 UFC mL⁻¹, no desenvolvimento de mudas de tomateiro.
- Tabela 2** Número de células de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* por grama de raiz determinado pela técnica de PCR quantitativo em tempo real das raízes de tomateiros cujas plantas foram obtidas pela aplicação da mistura de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (Quartzo[®]) na concentração 1×10^{10} unidades formadoras de colônias (UFC mL⁻¹).
- Tabela 3** Unidades Formadoras de Colônias de bactérias por grama de rizosfera de tomateiros obtidos por diferentes formas e momento de aplicação da mistura de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (Quartzo[®]) na concentração 1×10^{10} UFC mL⁻¹.
- Tabela 4** Porcentagem de incremento, em relação ao controle não inoculado, das variáveis relacionadas ao desenvolvimento de tomateiro cultivado em rizotrons após a aplicação mistura de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* nas concentrações 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} e aplicação separada de *B. subtilis* (BS) e *B. licheniformis* (BL) na concentração 1×10^8 UFC mL⁻¹.
- Tabela 5** Severidade (área abaixo da curva do progresso da doença – AACPD) e sintomas internos (notas de 1 a 6) da murcha de Fusarium em plantas de tomate cultivadas em solo infestado com *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3 (FOL), submetidas à aplicação da mistura de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*, na concentração de 1×10^{10} UFC mL⁻¹, nas mudas (M); no substrato de transplantio (S); nas mudas e no substrato de transplantio (MS); nas mudas, no substrato de transplantio e 10 dias após o transplante (MS10) e aplicação nas mudas, no substrato de transplantio e 10 e 20 dias após o transplante (MS1020).
- Tabela 6** Composição de macro e micronutrientes do limbo foliar de tomateiro tratados com a mistura de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* na concentração de 1×10^{10} UFC mL⁻¹ e cultivados em solo infestado com *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3 (FOL). Dados do primeiro

ensaio.

Tabela 7 Severidade (área abaixo da curva do progresso da doença – AACPD) e sintomas internos (notas de 1 a 6) da murcha de *Fusarium* em plantas de tomate cultivadas em solo infestado com *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3 (FOL), submetidas à aplicação de *Bacillus subtilis* (BS) e *Bacillus licheniformis* (BL), separadamente, na concentração de 1×10^8 UFC mL⁻¹, nas mudas (M); no substrato de transplântio (S); nas mudas e no substrato de transplântio (MS); nas mudas, no substrato de transplântio e 10 dias após o transplante (MS10) e aplicação nas mudas, no substrato de transplântio e 10 e 20 dias após o transplante (MS1020).

Tabela 8 Massas frescas da parte aérea e do sistema radicular (g) de plantas de tomate cultivadas em solo infestado com *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3 (FOL), submetidas à aplicação de *Bacillus subtilis* (BS) e *Bacillus licheniformis* (BL), separadamente, na concentração de 1×10^8 UFC mL⁻¹, nas mudas (M); no substrato de transplântio (S); nas mudas e no substrato de transplântio (MS); nas mudas, no substrato de transplântio e 10 dias após o transplante (MS10) e aplicação nas mudas, no substrato de transplântio e 10 e 20 dias após o transplante (MS1020).

Tabela 9 Composição de macro e micronutrientes do limbo foliar de tomateiro tratados com células dos isolados de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* aplicados individualmente na concentração de 1×10^8 UFC mL⁻¹ e cultivadas em solo infestado com *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3 (FOL). Dados do primeiro ensaio.

LISTA DE ABREVIATURAS

| | | |
|--------|---|---|
| AACPD | - | Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença |
| BDA | - | Batata Dextrose Ágar |
| BD | - | Batata Dextrose |
| CTC | - | Capacidade de Troca de Cátions |
| DAS | - | Dias Após o Semeadura |
| DAT | - | Dias Após o Transplante |
| FOL | - | <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> |
| f. sp. | - | <i>formae speciales</i> |
| MFPA | - | Massa Fresca da Parte Aérea |
| MFSR | - | Massa Fresca do Sistema Radicular |
| MSPA | - | Massa Seca da Parte Aérea |
| MSR | - | Massa Seca do Sistema Radicular |
| pH | - | Potencial Hidrogeniônico |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 17 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA..... | 18 |
| 2.1. Cultura do tomate..... | 18 |
| 2.2. Murcha de <i>Fusarium</i> do tomateiro | 19 |
| 2.3. Gênero <i>Bacillus</i> | 20 |
| 2.3.1. Promoção de crescimento de plantas mediado por <i>Bacillus</i> | 21 |
| 2.3.2. O uso de <i>Bacillus</i> no controle biológico da murcha de <i>Fusarium</i> no tomateiro | 21 |
| 3. MATERIAL E METODOS | 22 |
| 3.1. Origem dos isolados de <i>Bacillus</i> e do <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> raça 3...22 | |
| 3.2. Efeito da mistura de <i>B. subtilis</i> e <i>B. licheniformis</i> na germinação de sementes e emergência de plântulas de tomate. | 23 |
| 3.3. Efeito da concentração e da forma de aplicação de <i>B. subtilis</i> e <i>B. licheniformis</i> no crescimento das mudas de tomate..... | 24 |
| 3.4. Avaliação da presença e quantificação de <i>B. subtilis</i> e de <i>B. licheniformis</i> nas plantas de tomate..... | 24 |
| 3.5. Efeito de <i>B. subtilis</i> e de <i>B. licheniformis</i> aplicados em mistura ou separadamente na promoção de crescimento de plantas de tomate desenvolvidas em rizotrons..... | 26 |
| 3.6. Controle da murcha de <i>Fusarium</i> com <i>Bacillus</i> | 27 |
| 3.6.1. Controle da murcha de <i>Fusarium</i> pela aplicação da mistura de <i>B. subtilis</i> e <i>B. licheniformis</i> (Quartzo [®]) e aplicação das cepas separadamente | 28 |
| 3.6.2. Efeito da concentração da mistura <i>B. subtilis</i> e <i>B. licheniformis</i> e das cepas separadamente no controle da murcha do tomateiro | 30 |
| 3.7. Análise Estatística..... | 31 |
| 4. RESULTADOS | 31 |
| 4.1. Efeito da mistura de <i>B. subtilis</i> e <i>B. licheniformis</i> na germinação de sementes e emergência de plântulas de tomate. | 31 |

| | |
|--|-----------|
| 4.2. Efeito da concentração e da forma de aplicação da mistura de <i>B. subtilis</i> e <i>B. licheniformis</i> no crescimento das mudas de tomate..... | 33 |
| 4.3. Avaliação da presença e quantificação de <i>B. subtilis</i> e de <i>B. licheniformis</i> nas plantas de tomate..... | 35 |
| 4.4. Efeito de <i>B. subtilis</i> e de <i>B. licheniformis</i> aplicados em mistura ou separadamente na promoção de crescimento de plantas de tomate desenvolvidas em rizotron | 40 |
| 4.5. Controle da murcha de Fusarium com <i>Bacillus</i> | 44 |
| 4.5.1. Efeito da mistura de <i>B. subtilis</i> e <i>B. licheniformis</i> (Quartzo [®]) no controle da murcha de Fusarium do tomateiro..... | 44 |
| 4.5.2. Controle da murcha de Fusarium utilizando as cepas de <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Bacillus licheniformis</i> aplicadas separadamente nas plantas de tomate..... | 49 |
| 4.5.3. Efeito da concentração da mistura <i>B. subtilis</i> e <i>B. licheniformis</i> e das cepas separadamente no controle da murcha do tomateiro | 53 |
| 5. DISCUSSÃO | 55 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 57 |
| REFERÊNCIAS | 58 |

1. INTRODUÇÃO

O tomate (*Solanum lycopersicum*) é uma das hortaliças mais cultivada e consumida no mundo (MORRIS e TAYLOR, 2017). O Brasil ocupa a nona posição entre os maiores produtores de tomate. Em 2019, a produção brasileira foi de, aproximadamente, 4 milhões de toneladas, com produtividade média de 69 ton ha⁻¹ e área cultivada de 57 mil ha. O estado de Goiás é o maior produtor, sendo seguido pelos estados de São Paulo, Minas Gerais e Bahia (IBGE, 2019).

A tomaticultura é considerada de alto risco devido à grande exigência de insumos e serviços, variações de preços e, principalmente, pela suscetibilidade ao ataque de pragas e doenças (LOOS et al., 2008). Segundo Reis (2012), mais da metade das doenças que atacam a cultura são causadas por fungos, que podem infectar os diversos órgãos da planta, sejam eles raízes, folhas, hastes, flores e frutos. Dentre as doenças causadas por fungos, as que acometem o sistema vascular são devastadoras, causando problemas para a tomaticultura. Um exemplo é a murcha de Fusarium, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder & Hansen (FOL) (1953) que pode acarretar perdas de até 100% na produção (MARTINS, 2005; DOS SANTOS JÚNIOR et al., 2009), em variedades que não possuem resistência à raça presente.

Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici* é um patógeno conhecido pela dificuldade do seu manejo, isso devido a sua capacidade de sobreviver nos restos culturais, em hospedeiros alternativos e no solo, na forma de clamidósporos, sobrevivendo por longo tempo na área (ANIMASHAUN et al., 2017; PRIHATNA et al., 2018). A disseminação pode ocorrer por sementes, mudas, maquinário, água de enxurrada e tratos culturais como poda e tutoramento das plantas, tornando o controle ainda mais complicado (AGRIOS, 2005). Atualmente, esse patógeno é agrupado em três raças fisiológicas com base na capacidade de infectar e causar doença em cultivares com diferentes genes de resistência (SRINIVAS et al., 2019).

O controle do FOL é realizado, principalmente, pelo emprego de variedades resistentes, possuindo grande importância as que possuem genes piramidados para as diferentes raças do patógeno (DORDEVIC et al., 2012). A rotação de cultura, adubação equilibrada e o controle químico também são recomendados para o controle e redução do inóculo. O controle químico pode ser realizado utilizando produtos com o ingrediente ativo metam-sódio no pré-plantio da cultura (AGROFIT, 2019). Porém, o controle químico não é efetivo e nem economicamente viável (LOPES e ÀVILA, 2003). A entrada da raça 3 de FOL

no país comprometeu parte das variedades resistentes, haja visto que a maioria das cultivares possui resistência para as raças 1 e 2 e poucas cultivares possuem resistência para raça 3 (BIJU et al., 2017). Outros motivos que comprometem o uso de cultivares resistente é o elevado custo das sementes dessas novas variedades e também a preferência dos produtores por cultivares com melhores características agronômicas que não possuem resistência à raça 3 de FOL. Nesse sentido, o controle biológico pode ser uma alternativa eficaz e promissora para o controle de doenças de difícil manejo, além de poder promover o crescimento das plantas (TAHIR et al., 2017; ABDALLAH et al., 2018).

Alguns agentes de biocontrole podem ser empregados para proteger as plantas de tomates contra a murcha de *Fusarium*, incluindo microrganismos dos gêneros *Bacillus* e *Trichoderma* (SALLAM et al., 2019; CUCU et al., 2020). O gênero *Bacillus* possui grande relevância, pois apresenta um complexo arsenal de mecanismos de ação, dentre eles a síntese de substâncias antimicrobianas, a produção de compostos voláteis e a competição (LEELASUPHAKUL et al., 2008), além de induzir respostas de resistência sistêmica (LANNA FILHO, 2011). Podem ainda, estimular o crescimento da planta por meio da produção de hormônios e disponibilização de nutrientes e também pela supressão de patógenos e pela inativação de compostos tóxicos (ABDALLAH et al., 2018). Outro fato que torna esse grupo importante é a formação de estruturas de resistência chamadas de endósporos, que facilita a sua formulação e aumenta o tempo de prateleira.

Considerando os diversos aspectos apresentados acima, o presente trabalho teve como objetivos avaliar a eficiência de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*, isoladamente ou em mistura, em promover o crescimento e controlar a murcha de *Fusarium* causada por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3 em tomateiro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cultura do tomate

O tomate é a olerícola mais produzida e consumida no mundo, isso devido à possibilidade de ser cultivado em diversas condições edafoclimáticas e pela forma de consumo, *in natura* ou processado (MORAIS, 2017). A tomaticultura apresenta grande importância socioeconômica, sendo uma das principais fontes de renda para os produtores familiares e empregando grande número de pessoas nas suas duas cadeias produtivas, tomate de mesa e tomate para a indústria (CARVALHO et al., 2014).

O Brasil ocupa a nona posição no ranking de produção de tomate no mundo, ficando atrás da China, Índia, Turquia, Estados Unidos, Egito, Irã, Itália, México e Brasil (FAOSTAT, 2017). A produção nacional de tomate foi de 4 milhões de toneladas na safra 2019, com uma redução 2,0% em relação ao ano de 2018. A área plantada também sofreu uma redução de 3,4%, ocupando 57,650 mil ha. Entretanto, o rendimento médio da cultura aumentou 1,6 % em relação ao ano anterior. O estado de Goiás é o maior produtor, seguido pelos estados de São Paulo, Minas Gerais e Bahia (IBGE, 2019).

2.2. Murcha de Fusarium do tomateiro

A fusariose do tomateiro ou murcha de Fusarium, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, pode manifestar sintomas em qualquer estágio fenológico da cultura, sendo mais visíveis nas épocas de florescimento e frutificação, onde essas estruturas reprodutivas demandam maior quantidade de água e de nutrientes. No campo, os sintomas são observados em reboleiras, iniciando com o amarelecimento das folhas mais velhas, murcha da planta nas horas mais quentes do dia, que evolui para murcha definitiva e morte da planta. O caule, quando cortado em sentido longitudinal, apresenta coloração marrom característica na região do xilema da planta como consequência da colonização do fungo (PEREIRA et al., 2013).

As principais características morfológicas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Ascomycota, Hypocreales) são: presença de monofiálides no micélio aéreo, estas são curtas e grossas e não ramificadas e de microconídios, que podem ser sem septos ou com um septo. Este fungo possui similaridades morfológica com outros pertencentes às espécies de *F. oxysporum*, porém são separados devido à especialização e patogenicidade ao tomateiro.

Esse patógeno encontra-se distribuído na maioria das áreas cultivadas com tomateiro e, uma vez presente na área, pode permanecer por muitos anos no local, sobrevivendo nos restos culturais, em hospedeiros alternativos, no solo e por meio dos clamidósporos. FOL também produz macro e microconídios que são os responsáveis, juntamente com os clamidósporos, pela disseminação e introdução do patógeno na área. A forma mais comum de introdução desse patógeno na área é por meio de sementes contaminadas, mudas, maquinário, água de enxurrada e trânsito de pessoas de uma área contaminada para outra livre do patógeno. Na lavoura, a disseminação se dá, principalmente, pela água de chuva e irrigação, pela movimentação de solo e também por tratos culturais como poda e tutoramento das plantas (MCGOVERN, 2015; JOSHI, 2018).

A faixa de temperatura para o crescimento do fungo varia de 21 °C a 33 °C, com ótimo em torno de 28 °C. O patógeno apresenta bom estabelecimento em solos ácidos, pobres e deficiente em nutrientes, como o cálcio, fósforo e nitrogênio, e com elevados teores potássio (REIS e LOPES, 2012). A presença de fitonematoides também contribui para o desenvolvimento da doença, uma vez que estes criam uma porta de entrada para o patógeno (LOPES et al., 2003).

Esse patógeno é agrupado em três raças fisiológicas com base na capacidade de infectar e causar doença em cultivares diferenciadas que contém genes de resistência à *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (SRINIVAS et al., 2019). No mundo, três raças desse patógeno podem ser encontradas. No Brasil, as raças 1 e 2 são amplamente difundidas pelo território e a raça 3 encontra-se com uma distribuição geográfica limitada, estando presentes em alguns locais de clima ameno da região sudeste, nos estados do Espírito Santo (REIS et al., 2005), Rio de Janeiro (REIS; BOITEUX, 2007), Bahia (BARBOZA et al., 2013) e Minas Gerais (GONÇALVES et al., 2013). Entretanto, não se conhece a distribuição real do patógeno no país.

As principais medidas de controle são: uso de cultivares resistentes, correção da fertilidade, rotação de cultura com plantas não hospedeiras, eliminação de restos culturais, e impedir a disseminação do patógeno para áreas não contaminadas (AGRIOS, 2005; AMORIM et al., 2016). Nas áreas onde o patógeno não ocorre deve se adotar medidas de exclusão, impedindo a entrada do patógeno na área. Para o controle químico, é recomenda-se produtos com o ingrediente ativo metam-sódico (AGROFIT, 2019). O controle biológico pode ser utilizado empregando produtos à base de *Bacillus subtilis* e *Trichoderma harzianum* cepa T-22 (AGROFIT, 2019).

2.3. Gênero *Bacillus*

As bactérias do gênero *Bacillus* são caracterizadas como Gram-positivas, aeróbia ou anaeróbia facultativa, crescem em várias fontes de carbono, são produtoras de enzimas, a morfologia da célula bacteriana é em forma de bastonete e formam endósporos (MADIGAN et al., 2016). Segundo Euzéby (2017), esse gênero possui atualmente 336 espécies que podem ser encontradas em diversos ambientes, apresentando boa capacidade adaptativa, sobrevivendo a grandes variações de temperatura, osmolaridade e disponibilidade de fontes de carbono (LANNA FILHO, 2010). Em condições desfavoráveis de umidade e temperatura, os *Bacillus* produzem endósporos que são estruturas que resistem a essas condições e podem

permanecer no solo por muitos anos até o restabelecimento das condições favoráveis (MADIGAN et al., 2016).

O gênero *Bacillus* é amplamente estudado como agente de biocontrole para as mais diversas culturas, agentes patogênicos e como bioestimulante para plantas, sendo componente de mais de 50% dos produtos biológicos (CAWOY et al., 2011). A importância desse gênero, reside na diversidade de mecanismos de ação envolvidos no biocontrole e pela formação de endósporos, que facilita a sua formulação. No Brasil, existem 37 produtos registrados à base de *Bacillus* spp., desses 23 são bioinseticidas formulados com *Bacillus thuringiensis* e 14 são registrados como nematicidas e biofungicidas sendo formulados com *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus methilotrophicus*, *Bacillus licheniformis* e *Bacillus amyloliquefaciens*. Para o controle de FOL existem três produtos biológicos registrados no país, sendo um deles formulado com *B. subtilis* (AGROFIT, 2019).

2.3.1. Promoção de crescimento de plantas mediado por *Bacillus*

O estímulo do crescimento de plantas mediado por *Bacillus* spp. pode ser direto ou indiretamente. A ação direta está relacionada com a produção de reguladores de crescimento, tais como: auxina, citocinina e giberelina, pela melhora na nutrição das plantas relacionada à maior disponibilidade de fósforo e a fixação de nitrogênio e pela produção de sideróforos. A ação indireta ocorre pela melhora da sanidade da planta, o que refletirá em um melhor crescimento e desenvolvimento da cultura (AYSAL et al., 2014; KUNDAN et al., 2015; WU et al., 2015; GUPTA et al., 2016; XU et al., 2016).

Diversos autores demonstraram que *Bacillus* spp. podem estimular o crescimento e aumentar o rendimento de diversas espécies de plantas (YASMIN et al. 2016; PATEL et al., 2017; ADREES et al., 2018). Entretanto, alguns trabalhos relatam que muitas das cepas isoladas e selecionadas por promover o crescimento em uma espécie vegetal, pode não ter o mesmo efeito em outras espécies e, em solos diferentes (ABDALLAH et al., 2018; AZIZOGLU, 2019). Sendo, portanto, necessário selecionar e testar o potencial de diversas cepas em distintas culturas e regiões.

2.3.2. O uso de *Bacillus* no controle biológico da murcha de *Fusarium* no tomateiro

Um vasto arsenal de mecanismos de ação pode ser empregado por *Bacillus* spp., dentre eles, síntese de substâncias antimicrobianas, produção de compostos voláteis, competição por nutrientes e espaço (LEELASUPHAKUL et al., 2008). Podem ainda induzir a

resistência sistêmica (RYU et al., 2004) e promover o crescimento das plantas (TAHIR et al., 2017). Essa diversidade de mecanismo torna a sua capacidade de biocontrole aumentada, devido a ação sinérgica entre os mecanismos (FALARDEAU et al., 2013). A espécie tipo desse gênero é o *B. subtilis* (COHN, 1872). Essa espécie é considerada uma das mais eficazes no biocontrole de doenças de plantas por apresentar antagonismo envolvendo diferentes modos de ações (LEELASUPHAKUL et al., 2008).

Abdallh et al. (2018), comprovaram a eficiência de *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* no controle da murcha de Fusarium em tomateiro, observando redução de 82,3% e 88,2% na severidade da doença, respectivamente. Jangir et al. (2018), trabalhando com *Bacillus* spp. isolados de plantas de tomate de regiões infestadas com FOL, obtiveram redução de 36% da incidência da doença. Patel et al. (2017) demonstraram que a utilização de *B. subtilis* e *B. licheniformis* reduziu a incidência de FOL. Caniato (2018) evidenciou que rizobactérias apresentaram potencial em promover crescimento e induzir resistência a *Corynespora cassiicola* em plântulas de tomateiro. Mates et al. (2017) citam *B. methylotrophicus* com capacidade de induzir resistência sistêmica em tomateiro à mancha bacteriana causada por *Xanthomonas perforans*. Sahu et al. (2019) verificaram que *Bacillus* aumentou a atividade das enzimas polifenoloxidase, peroxidase, fenilalanina amônia liase e ascorbato oxidase em plantas de tomate. Adrees et al. (2019) demonstraram que *B. subtilis* e *B. megaterium* induziram a resistência sistêmica em algodoeiro contra a podridão radicular causada pelo fungo *Macrophomina phaseolina*, elevando os níveis de polifenoloxidase, peroxidase e fenilalanina amônia liase nas plantas.

3. MATERIAL E METODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Ambiental “Raquel Ghini” da Embrapa Meio Ambiente (22°43’36”S e 47°00’59”W), localizado no Município de Jaguariúna, no Estado de São Paulo. O clima na região é classificado como subtropical úmido (Cfa de acordo com a classificação de Köppen), apresentando verões quentes e chuvosos e invernos frios e secos.

3.1. Origem dos isolados de *Bacillus* e do *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3

Os isolados de *Bacillus subtilis* (FMCH002) e de *Bacillus licheniformis* (FMCH001) foram provenientes do produto comercial Quartzo[®] produzido pela Chr. Hansen (Valinhos, SP) e distribuído pela FMC Química do Brasil Ltda. (Campinas, SP). O *Fusarium oxysporum*

f. sp. *lycopersici* raça 3 isolado 149 foi fornecido pela Sakata Seed Sudamérica (Bragança Paulista, SP).

3.2. Efeito da mistura de *B. subtilis* e *B. licheniformis* na germinação de sementes e emergência de plântulas de tomate.

Sementes de tomate da cultivar Santa Clara[®] foram desinfestadas superficialmente em álcool (70%) por dois minutos e em sequência em hipoclorito de sódio (2,5%) pelo mesmo tempo e lavadas três vezes em água destilada autoclavada e, em seguida mantidas em câmara asséptica sobre papel filtro esterilizado para secagem. Após secagem, as sementes foram colocadas em Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL da suspensão dos isolados de *B. subtilis* e *B. licheniformis* (Quartzo[®] - FMC, Campinas, SP) nas concentrações de 0, 1×10^8 , 1×10^9 e 1×10^{10} UFC mL⁻¹. Após 1 hora de agitação a 100 rotação por minuto (rpm), as sementes foram secas sobre papel filtro por 1 hora. A semeadura foi realizada em papel germitest (três folhas), umedecido com água destilada em quantidade equivalente a 2,5 vezes o peso do papel seco, em caixas plásticas tipo “gerbox”. As caixas foram mantidas em câmara de crescimento a $25^\circ \pm 2^\circ \text{C}$ por 8 dias. A germinação das sementes foi avaliada cinco (primeira contagem) e oito dias após a montagem do teste e os resultados expressos em porcentagem de plântulas normais (BRASIL, 2009). A protrusão da radícula foi avaliada três dias após a semeadura. O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, cada repetição representada por uma caixa “gerbox” com 50 sementes cada uma. Os dados foram analisados por regressão a 5% de probabilidade.

Para avaliar o efeito da mistura contendo *B. subtilis* e *B. licheniformis* na germinação de sementes, no crescimento do sistema radicular e na formação de pelos radiculares de plântulas de tomate, em placas de Petri de vidro de 15 cm de diâmetro contendo meio Ágar Água (Himedia, Mumbai-Índia), foram semeadas cinco sementes de tomate tratadas, como descrito anteriormente, com a mistura de *Bacillus* na concentração 1×10^{10} UFC mL⁻¹ e como controle as sementes foram tratadas com água. As avaliações foram realizadas oito dias após a semeadura. O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com dois tratamentos e com dez repetições (uma placa com cinco sementes). O ensaio foi repetido duas vezes.

3.3. Efeito da concentração e da forma e momentos de aplicação de *B. subtilis* e *B. licheniformis* no crescimento das mudas de tomate

Sementes de tomate foram tratadas com a mistura contendo *B. subtilis* e *B. licheniformis*, como descrito anteriormente (tópico 3.2), nas concentrações de 0, 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 e 1×10^{10} UFC mL⁻¹. As sementes foram semeadas em bandejas de 200 alvéolos contendo substrato Tropstrato HT Hortaliças[®] (Mogi Mirim, SP). As massas frescas e secas da parte aérea e do sistema radicular foram avaliadas 38 dias após a emergência das plântulas. O ensaio foi conduzido em blocos ao acaso com dez repetições (bandeja), sendo que foi semeada uma linha com 10 alvéolos para cada tratamento/bandeja.

Posteriormente, foi avaliado o efeito de formas e momento de inoculação da mistura de *B. subtilis* e *B. licheniformis* (Quartzo[®]), na concentração de 1×10^9 UFC mL⁻¹, nas plantas sobre o seu desenvolvimento. As seguintes formas e momentos de aplicação foram realizadas: 1- controle com água; 2 - aplicação da mistura de *Bacillus* no substrato de semeadura; 3 - aplicação da mistura de *Bacillus* no tratamento de semente; 4 - aplicação da mistura de *Bacillus* sete dias após a semeadura (DAS); 5 - aplicação da mistura de *Bacillus* no substrato antes da semeadura e nas sementes; 6 - aplicação da mistura de *Bacillus* no substrato antes e sete DAS; 7 - aplicação da mistura de *Bacillus* nas sementes e no substrato sete DAS; 8 - aplicação da mistura de *Bacillus* nas sementes e no substrato antes e sete DAS. No substrato antes e sete dias após a semeadura foram aplicados 2,5 mL da suspensão da mistura de *Bacillus* (Quartzo[®] – FMC, Campinas, SP). O tratamento de semente foi realizado conforme descrito no tópico 3.2. Neste ensaio foram semeadas duas sementes por alvéolo e sete dias após a emergência foi retirada uma plântula. As avaliações da emergência foram realizadas sete dias após a semeadura e as massas frescas e secas da parte aérea e do sistema radicular foram determinadas 26 dias após a semeadura. O ensaio foi conduzido em bandejas plásticas contendo 105 alvéolos com 10 blocos ao acaso. Cada bloco foi constituído por uma bandeja com oito tratamentos e sete alvéolos (uma linha) por tratamento.

3.4. Avaliação da presença e quantificação de *B. subtilis* e de *B. licheniformis* nas plantas de tomate

Para avaliar a presença e quantificar os isolados de *Bacillus subtilis* (FMCH002) e de *Bacillus licheniformis* (FMCH001) no sistema radicular de plantas de tomate, 2,5 mL da suspensão da mistura dos isolados de *B. subtilis* e de *B. licheniformis* (Quartzo[®]) foi aplicada

na concentração 1×10^{10} UFC mL⁻¹. As seguintes formas e momentos de aplicação foram realizadas: 1- controle com água; 2 - aplicação da mistura de *Bacillus* no substrato de semeadura; 3 - aplicação da mistura de *Bacillus* nas sementes; 4 - aplicação da mistura de *Bacillus* no substrato de semeadura e nas sementes; 5 - aplicação da mistura de *Bacillus* sete dias após o transplante (DAT); 6 - aplicação da mistura de *Bacillus* no substrato de semeadura e sete DAT; 7 - aplicação da mistura de *Bacillus* nas sementes e no substrato sete DAT; 8 - aplicação da mistura de *Bacillus* no substrato de transplante; 9 - aplicação da mistura de *Bacillus* no substrato de semeadura e no substrato de transplante; 10 - aplicação da mistura de *Bacillus* nas sementes e no substrato de transplante; 11 - aplicação da mistura de *Bacillus* no substrato de semeadura, nas sementes, substrato de transplante e sete DAT. Inicialmente o produto foi aplicado em bandejas de 200 alvéolos e após 14 dias, realizou o transplante dessas mudas para vasos de 500 mL com o mesmo substrato (Tropstrato HT Hortaliças®). O ensaio foi conduzido com 14 blocos ao acaso, de dois blocos foram coletadas plantas para realizar o isolamento das bactérias endofíticas e da rizosfera para determinar o número de bactérias totais. De outros dois blocos, as plantas foram coletadas para análise da presença dos isolados de *B. subtilis* e de *B. licheniformis* nas raízes das plantas via PCR quantitativa em tempo real (qPCR).

Para a quantificação de *B. licheniformis* (FMCH001) e *B. subtilis* (FMCH002) por qPCR, foi realizada a extração de DNA total das amostras utilizando 180 mg de raiz. Para a extração foi utilizado o kit MP Biomedicals™ FastDNA™ SPIN para o solo, de acordo com as instruções do fabricante. A reação de qPCR foi realizada em um volume final de 12 µL, composta de 5,0 µL de DNA, 6,25 µL de SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad) e 0,25 µL de cada primer. Foram utilizados pares de primers específicos para cada cepa (dados não publicados). Para amplificação foi utilizado o ciclo de desnaturação inicial de 98 °C por 3 minutos e 45 ciclos de 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 30 segundos e 72 °C por 25 segundos. Todos os tratamentos foram avaliados em duplicata biológica e em triplicata técnica. Os valores obtidos foram estimados a partir de curvas padrão para cada cepa, obtidas a partir de valores 1×10^3 a 1×10^8 UFC g⁻¹ de raiz.

Para determinar as bactérias totais da rizosfera, 5 g de raízes e substrato da rizosfera foram adicionados em Erlenmeyer de 125 mL contendo 45 mL de solução de MgSO₄·7H₂O (0,01 M). Após agitação por 5 minutos, em mesa agitadora a 100 rpm, e 5 minutos em ultrassom, foram realizadas diluições em série de 10⁻¹ a 10⁻⁵. Em seguida, 0,1 mL de cada diluição foi transferido para placas de Petri contendo meio de cultura ágar nutriente (Himidia,

Mumbai-Índia). As placas foram mantidas em câmara de crescimento com temperaturas a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e as contagens das colônias foram realizadas após 24 e 48 horas. Foram consideradas apenas as contagens que variaram de 30 a 300 colônias/placa (CLARK, 1965; SCHORTEMAYER et al., 1996). O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com três repetições, cada repetição representava uma placa de Petri. Para os cálculos utilizou a diluição de 10^{-4} .

O isolamento de bactérias da haste e da seiva das plantas de tomate foi realizado de duas formas. Inicialmente, fragmentos das hastes foram coletados da base da planta e desinfestados superficialmente em álcool 70% (por 2 minutos), hipoclorito 2,5 % (por 2 minutos) e lavados em água destilada autoclavada. Na sequência os fragmentos foram transferidos para meio de cultura nutriente ágar - NA (Himedia, Mumbai-Índia). Também foi realizado isolamento de bactérias diretamente da seiva da planta. Para tanto, foi realizado corte transversal da haste e coletada a seiva exsudada com auxílio de micropipeta. A seiva exsudada foi transferida para placas de Petri contendo meio NA.

Além desse ensaio, em que foi realizado o isolamento das bactérias das hastes e da seiva, um segundo foi conduzido no mesmo esquema descrito anteriormente, exceto pela esterilização do substrato por meio de autoclavagem por 3 vezes de uma 1 hora e em 3 dias consecutivos. O isolamento de bactérias da seiva e da haste foi realizado como descrito no parágrafo anterior.

3.5. Efeito de *B. subtilis* e de *B. licheniformis* aplicados em mistura ou separadamente na promoção de crescimento de plantas de tomate desenvolvidas em rizotrons

Para avaliar a promoção de crescimento em rizotrons, mudas de tomate (cultivar Santa Clara[®], Bragança Paulista, SP) foram produzidas como descrito no tópico item 3.3, sendo transplantadas para rizotrons construídos em tubos de PVC de 17,5 de diâmetro de 100 cm de comprimento, cortados longitudinalmente ao meio, contendo mistura de substrato Terra Nostra[®] (Tatui, SP) e solo na proporção de 1:3 (v/v). O solo foi coletado na área da fazenda experimental da Embrapa Meio Ambiente, apresentando os seguintes atributos químicos e físicos analisados a 0-20 cm de profundidade: pH em H₂O = 4,3; M.O. = 32,3 g Kg⁻¹; P = 9,36 mg dm⁻³; Ca = 3,09 cmol_c dm⁻³; Mg = 1,48 cmol_c dm⁻³; K = 128,55 mg dm⁻³; SB = 4,95 cmol_c dm⁻³; H+Al = 6,10 cmol_c dm⁻³; t = 4,99 cmol_c dm⁻³; V% = 44,54.

O produto comercial Quartzo[®] contendo a mistura de *B. subtilis* e de *B. licheniformis* foi aplicado nas concentrações de 0, 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} UFC mL⁻¹. Também os isolados

de *B. subtilis* e de *B. licheniformis* foram aplicados separadamente na concentração de 1×10^8 UFC mL⁻¹. Os *Bacillus* foram aplicados no substrato da muda, no substrato de transplantio e 10 e 20 dias após o transplantio. O volume aplicado no substrato das mudas foi de 2,5 mL de suspensão de *Bacillus* e 10 ml nas demais aplicações. Os isolados individualmente de *B. subtilis* e de *B. licheniformis* foram multiplicados em Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL do meio GPL (glucose-10 g; peptona-10 g; extrato de levedura 5 g; NaCl-3 g; KH₂PO₄ 1 g; Mg SO₄.7H₂O 0,5 g; água destilada-1.000 ml, pH-6,0), sob agitação constante de 150 rpm e a 28 ± 2 °C. Após 48 h o conteúdo do Erlenmeyer foi transferido para tubo Falcon de 50 mL e centrifugado por 10 minutos a 8.000 rpm. Posteriormente, foi descartado o sobrenadante e o “pellet” ressuspensão em solução salina de NaCl a 0,85% e a concentração ajustada em espectrofotômetro (SHIMADZU®; UV-1601 PC) OD₅₄₀ = 2,250 nm, que corresponde 1×10^8 UFC mL⁻¹, sendo essa concentração confirmada pelo método da diluição em série.

O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições e seis tratamentos. Semanalmente foi avaliada a clorofila utilizando um clorofilômetro (SPAD- 502 Plus) e a altura das plantas. Aos 32 dias após o transplante, foi determinado o diâmetro da base da haste (mm), bem como a massa fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular (g), o volume do sistema radicular (mL) e o comprimento da raiz (cm). Os dados obtidos foram analisados por análise de variância ($p < 0,05$).

3.6. Controle da murcha de *Fusarium* com *Bacillus*

O inóculo do patógeno foi produzido em talco visando obter a formação de clamidósporos (BLOK,1997). Discos de 5 mm de diâmetro de colônias de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3, previamente crescido em meio BDA (Batata-dextrose-ágar, ACUMEDIA®, Michigan, EUA) durante sete dias, à temperatura de 25 ± 2 °C, foram transferidos para Erlenmeyer de 1.000 mL contendo 500 mL de meio de cultura BD (batata-dextrose, KASVI®, Mumbai, Índia) e mantido à 25 ± 2 °C, com agitação constante de 150 rpm por sete dias. Para 1.000 g de talco neutro (CHEMCO®) (densidade aparente $1,3-1,38$ g mL⁻¹ e umidade máx. 0,05%) foram transferidos 500 mL de suspensão do inóculo produzido em meio líquido. Em seguida a mistura foi homogeneizada até adquirir a consistência de uma pasta e colocada para secar durante 17 dias à temperatura de 21 ± 2 °C (De CAL et al., 1995) em sala com ar condicionado. Após a secagem foram determinadas as unidades formadoras de colônias (UFC) do inóculo pelo método de diluição em série, plaqueando-se as diluições 10^{-4} , 10^{-5} e

10^{-6} em meio de cultura semi-seletivo Nash-Snyder para *Fusarium* spp. (Nash & Snyder, 1962).

Mudas de tomateiro da cultivar Santa Clara[®] foram produzidas em substrato Tropstrato HT Hortaliças[®]. A semeadura foi realizada em bandejas plásticas com 200 células com volume por alvéolo de 12 cm³ e cultivadas em condições de casa de vegetação com irrigação por aspersão. O transplante de duas mudas por vaso foi realizado quando as mudas apresentavam a primeira folha verdadeiras completamente expandida.

Nos ensaios visando o controle da murcha de *Fusarium* foi utilizada uma mistura do substrato Tropstrato HT Hortaliças[®] (Mogi Mirim, SP) e solo (Seção 3.5) na proporção de 1:3 (v/v) contido em vasos plásticos de 3.000 mL. Para cada litro de substrato foi adicionado 5 g da fórmula NPK (10, 10, 10) e 1,2 g de calcário. O substrato foi infestado com FOL formulado em talco de forma homogênea e a concentração de *Fusarium* foi ajustada para 2×10^5 clamidósporos g⁻¹ de substrato, exceto o controle absoluto.

3.6.1. Controle da murcha de *Fusarium* pela aplicação da mistura de *B. subtilis* e *B. licheniformis* (Quartzo[®]) e aplicação das cepas separadamente

Os estudos foram divididos em duas partes. Na primeira foi estudada a mistura dos isolados de *B. subtilis* e *B. licheniformis* presentes no produto comercial Quartzo[®], aplicados na concentração 1×10^{10} UFC mL⁻¹. Para obter essa concentração, 10 g do produto comercial Quartzo[®], em sua formulação original contendo *B. subtilis* e *B. licheniformis*, na concentração de 1×10^{11} UFC g⁻¹ foram diluídos em 100 mL de água destilada autoclavada.

A mistura de *Bacillus* foi avaliada na concentração de 1×10^{10} UFC mL⁻¹ aplicada de diversas formas: nas mudas; no substrato de transplante; nas mudas e no substrato de transplante; aplicação nas mudas, no substrato de transplante e 10 dias após o transplante; e aplicação nas mudas, no substrato de transplante e 10 e 20 dias após o transplante; além da testemunha infestada e não infestada com *Fusarium*. Neste estudo as mudas foram transplantadas com 20 dias. O experimento foi instalado em 12 blocos casualizados com sete tratamentos, o ensaio foi repetido duas vezes.

Para o ensaio de controle da murcha de *Fusarium* usando os isolados de *B. subtilis* e *B. licheniformis* individualmente, o desenho experimental foi semelhante ao descrito anteriormente com 10 blocos. Também os tratamentos foram semelhantes. Contudo, quando separadamente, *B. subtilis* e de *B. licheniformis* foram aplicados na concentração 1×10^8 UFC

mL⁻¹, no mesmo modelo indicado anteriormente, totalizando 12 tratamentos. Neste estudo as mudas foram transplantadas com 24 dias. O ensaio foi repetido duas vezes.

Nos tratamentos onde a mistura de *B. subtilis* e de *B. licheniformis*, bem como *B. subtilis* e de *B. licheniformis* individualmente, foram aplicados nas mudas foram utilizados 2,5 mL no substrato em cada alvéolo das bandejas. A aplicação no substrato, tanto no momento do transplante, como aos 10 e 20 dias após o transplante, consistiu em aplicar 10 mL tanto da mistura quanto dos isolados individualmente em cada planta. A produção do inóculo de cada isolado individualmente foi feita em meio GPL como descrito na seção 3.5. Para os controles foi aplicado o mesmo volume de água.

As avaliações da doença foram realizadas considerando as severidades externa e internas. A severidade externa da doença foi avaliada semanalmente com base na escala diagramática proposta por Tokeshi & Galli (1966), com as seguintes notas: 1 - Planta sem sintomas; 2 - Planta com amarelecimento até a segunda folha; 3 - Planta com amarelecimento até a terceira folha; 4 - Planta murcha e sem amarelecimento; 5 - Plantas com murcha e amarelecimento; 6 - Planta morta. Os valores de severidade externa foram utilizados para o cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (CAMPBELL e MADDEN, 1990). Para a avaliação dos sintomas internos, no final do experimento, as hastes das plantas de tomateiro foram cortadas longitudinalmente verificando o escurecimento vascular desencadeado pelo patógeno, de acordo com a metodologia proposta por Tokeshi & Galli (1966) com algumas modificações, sendo as notas: 1 - Planta sadia sem sintomas externos ou internos observáveis no caule, cortado à altura do primeiro internódio logo acima dos cotilédones; 2 - Planta com vasos escurecidos na região do primeiro internódio sem outros sintomas visíveis; 3 - Planta com vasos escurecidos até a altura da primeira folha, com pelo menos um folíolo com amarelecimento; 4 - Planta com vasos escurecidos até a metade do comprimento do caule, com duas ou mais folhas com amarelecimento; 5 - Planta com vasos escurecidos até próximo ao ponteiro, apresentando a maioria das folhas murchas, com exceção do ponteiro; 6 - Planta morta ou com vasos escurecidos e folhas murchas até o ponteiro. Também foi analisado o efeito considerando apenas as plantas doentes (Tabela 5).

A altura das plantas de tomateiro foi determinada semanalmente com o auxílio de uma régua graduada, a partir da superfície do substrato contido no vaso até a gema apical da planta, os resultados foram expressos em centímetros. O diâmetro das hastes foi determinado com auxílio de paquímetro digital e expressos em milímetros (mm). A determinação da clorofila foi realizada no trifólio da terceira folha do colo para o ápice, utilizando um

clorofilômetro (SPAD- 502 Plus). Para avaliação da massa fresca e seca das plantas, a parte aérea foi separada do sistema radicular na região do colo das plantas de tomateiro, com o auxílio de uma tesoura. As raízes das plantas foram retiradas cuidadosamente dos vasos, sendo em seguida lavadas com jato de água retirando as partículas de substrato sem danificar as radículas. O sistema radicular e a parte aérea das plantas de tomateiro foram acondicionados em sacos de papel distintos. Para a massa fresca os sacos contendo as amostras foram pesados em balança de precisão antes de serem levados para a estufa de secagem. Para a massa seca, os sacos foram colocados em estufa de circulação à temperatura de 50 °C até obter peso constante. Após a secagem a determinação da massa seca do sistema radicular e da parte aérea foram realizadas por meio de pesagem das amostras.

Ao final, as folhas de todas as plantas dos primeiros ensaios com a mistura e com a aplicação das cepas *B. subtilis* e *B. licheniformis* separadamente, foram coletadas e separadas em seus respectivos tratamentos, maceradas, amostradas e enviadas ao Laboratório de Análise Foliar do Departamento de Ciências do Solos da Universidade Federal de Lavras para a quantificação de macro e micronutrientes presentes nas amostras.

Além das avaliações anteriores, foi realizado isolamento de FOL da haste das plantas de tomate tratadas com a mistura de *Bacillus subtilis* e *B. licheniformis*. Para o isolamento, fragmentos foram coletados da base da planta e desinfestados superficialmente em álcool 70% (por 2 minutos), hipoclorito 2,5% (por 2 minutos) e lavados em água destilada autoclavada. Posteriormente, os fragmentos foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar, ACUMEDIA[®], Michigan, EUA). As placas foram mantidas em BOD 25 ± 2 °C por cinco dias. Após o crescimento foi realizada a identificação das colônias crescidas, com base na morfologia.

3.6.2. Efeito da concentração da mistura *B. subtilis* e *B. licheniformis* e das cepas separadamente no controle da murcha do tomateiro

Neste estudo onde foi avaliado o efeito de doses do produto Quartzo[®] contendo a mistura de *B. subtilis* e de *B. licheniformis* no controle da murcha de *Fusarium*, as mudas de tomate com 20 dias foram transplantadas para vasos de 500 mL contendo mistura de terra e substrato (3:1). O solo foi infestado com o patógeno na concentração 2 x 10⁵ clamidósporos g⁻¹ de solo. O produto foi aplicado no substrato da muda e no substrato de transplântio, como descrito anteriormente, nas concentrações de 0, 1 x 10⁶, 1 x 10⁷, 1 x 10⁸, 1 x 10⁹ e 1 x 10¹⁰ UFC mL⁻¹. Também foram aplicados os isolados de *B. subtilis* e de *B. licheniformis*

separadamente na concentração 1×10^8 UFC mL⁻¹. O ensaio foi conduzido em blocos casualizado com cinco repetições e oito tratamento. Foi avaliado somente os sintomas internos dos tomateiros.

3.7. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o software estatístico RStudio[®]. Os dados da foram submetidos ao teste de Shapiro Wilk, para avaliar quanto à normalidade e distribuição dos dados. Quando necessário, os dados foram transformados em raiz quadrada de X. Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente por análise de variância ($p < 0,05$) pelo teste de Scott-Knott e regressão. Para os ensaios do item 3.6.1 foram realizadas análises dos dados de severidade tanto considerando todas as plantas, como somente as plantas doentes, isto é, foram excluídas as que não apresentaram sintomas da murcha de Fusarium, pois possivelmente ocorreu escape.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito da mistura de *B. subtilis* e *B. licheniformis* na germinação de sementes e emergência de plântulas de tomate.

Tanto a germinação quanto a protrusão das sementes de tomate tratadas com a mistura de *Bacillus subtilis* e de *B. licheniformis* (Quartzo[®], FMC, Brasil) foram diretamente proporcionais às concentrações avaliadas (1×10^8 , 1×10^9 e 1×10^{10} UFC mL⁻¹) (Figura 1).

No ensaio realizado em placas de Petri utilizando a mistura de *B. subtilis* e de *B. licheniformis* (Quartzo[®]), na concentração 1×10^{10} UFC mL⁻¹, embora nenhum teste estatístico tenha sido aplicado, foi observado, oito dias após a semeadura em ágar água, maior crescimento do sistema radicular e maior emergência das plântulas (Figura 2). Também foi observado aumento na formação de pelos radiculares nas plântulas originárias de sementes tratadas com a mistura de *B. subtilis* e de *B. licheniformis* em comparação com as tratadas com água (Figura 2). O ensaio foi repetido por duas vezes e os resultados seguiram a mesma tendência.

Figura 1. Porcentagem de germinação após cinco (A) e oito (B) dias após semente e protrusão (três dias após semente) da radícula (C) de sementes de tomate tratadas com a mistura de *Bacillus subtilis* e de *Bacillus licheniformis* (Quartzo[®]).

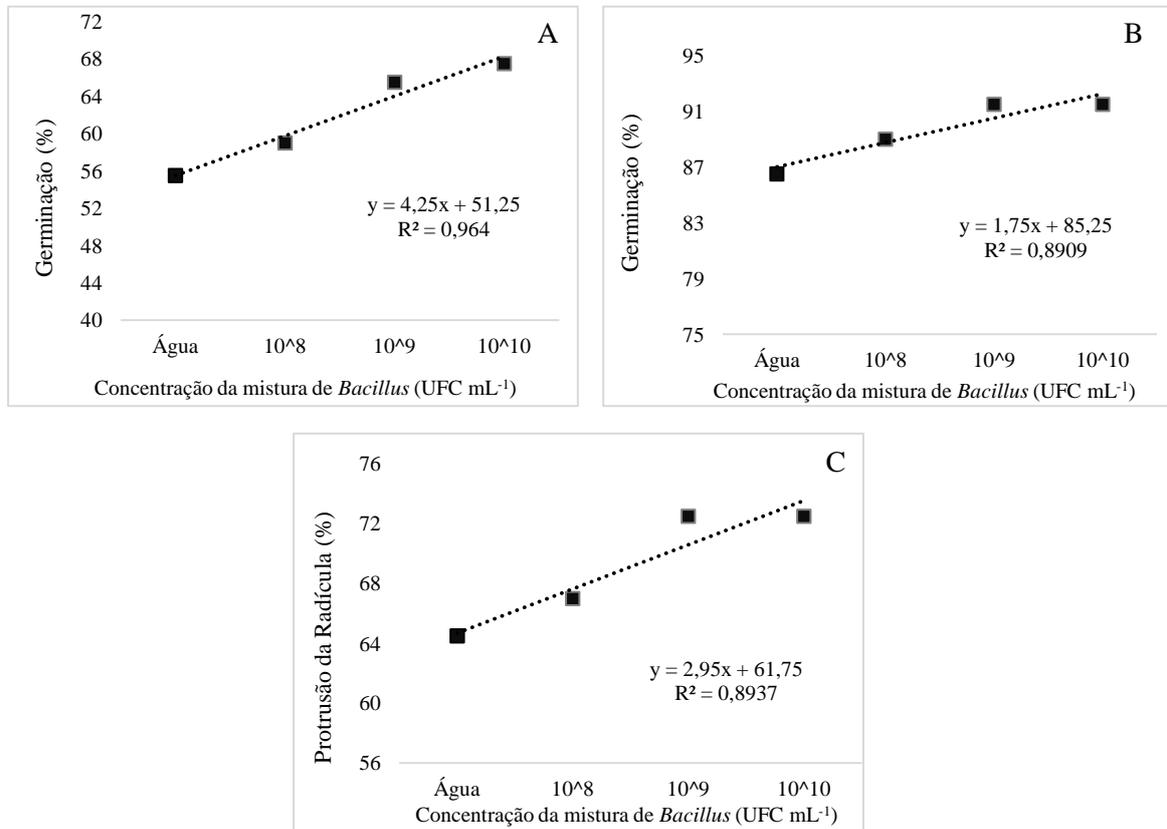
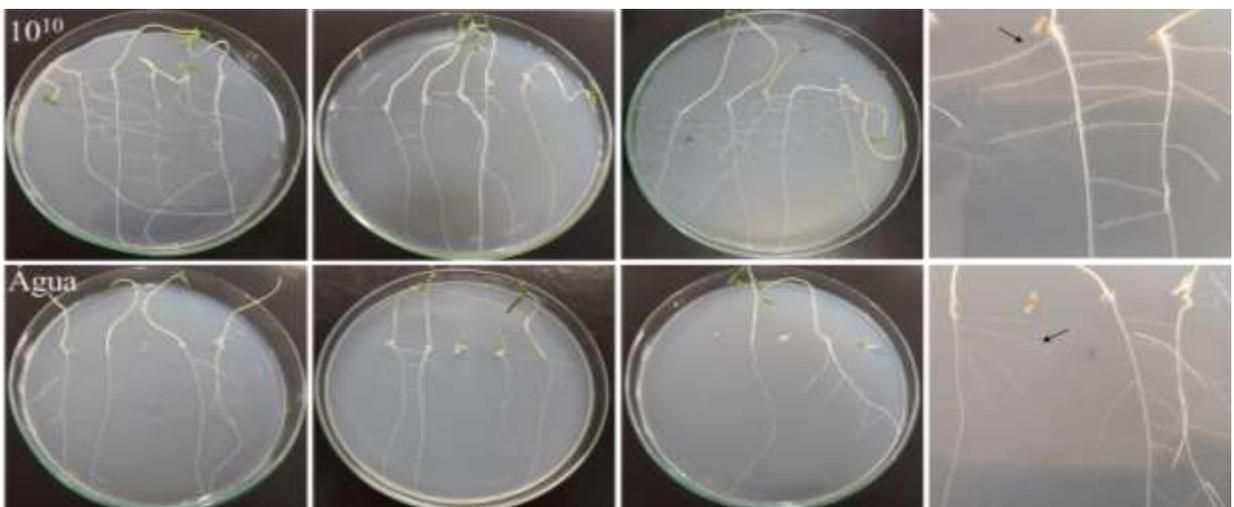


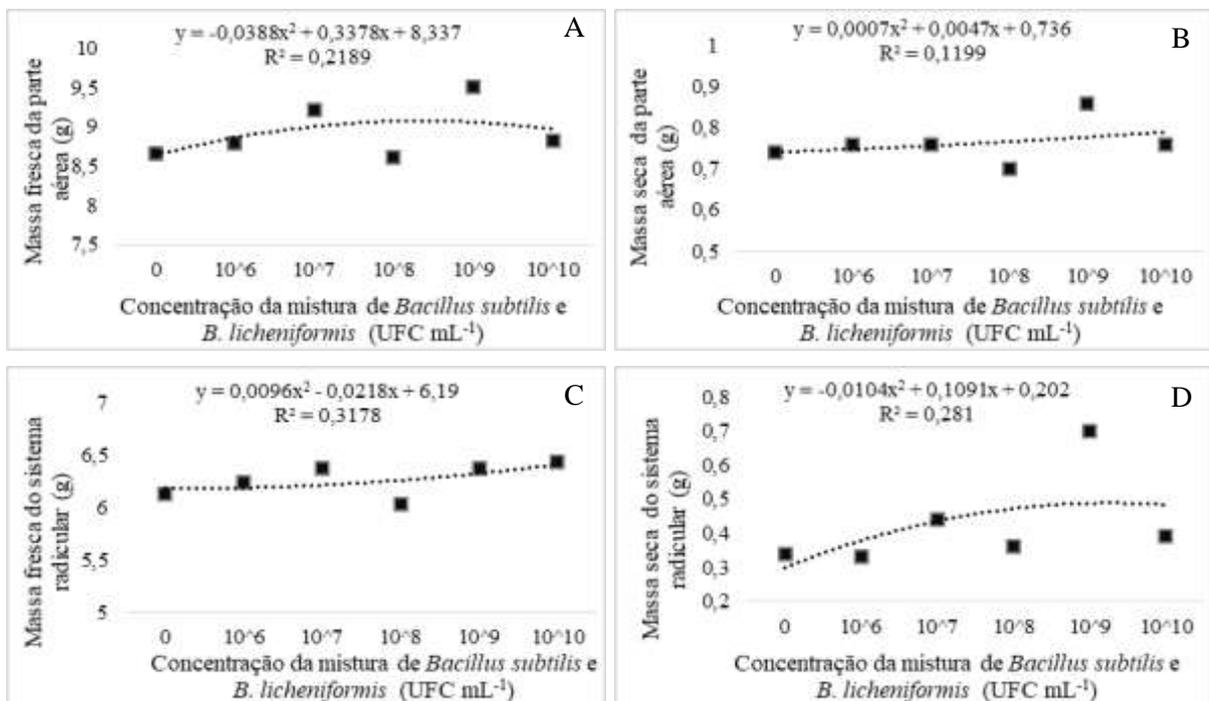
Figura 2. Germinação, crescimento do sistema radicular e formação de pelos radiculares de plântulas de tomate originárias de sementes tratadas com mistura de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (Quartzo[®]) na concentração de 1×10^{10} UFC mL⁻¹.



4.2. Efeito da concentração e da forma e momentos de aplicação da mistura de *B. subtilis* e *B. licheniformis* no crescimento das mudas de tomate

No ensaio em que foram avaliados os efeitos do tratamento de semente com a mistura contendo *B. subtilis* e *B. licheniformis*, não foram observadas diferenças significativas nas massas frescas e secas da parte aérea e do sistema radicular de plântulas de tomateiro entre os tratamentos (Figura 3).

Figura 3. Efeito do tratamento de semente de tomate com a mistura de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (Quartzo[®]) nas concentrações de 0, 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 e 1×10^{10} UFC mL⁻¹ nas massas secas e frescas da parte aérea e do sistema radicular das plântulas.



Para as formas de aplicação da mistura de *B. subtilis* e *B. licheniformis* (Quartzo[®]) também não foram observadas diferenças na emergência das plântulas e nas massas frescas e secas da parte aérea e do sistema radicular de plantas de tomate (Tabela 1).

Tabela 1. Efeito das formas e momentos de aplicação da mistura de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*, na concentração 1×10^9 UFC mL⁻¹, no desenvolvimento de mudas de tomateiro.

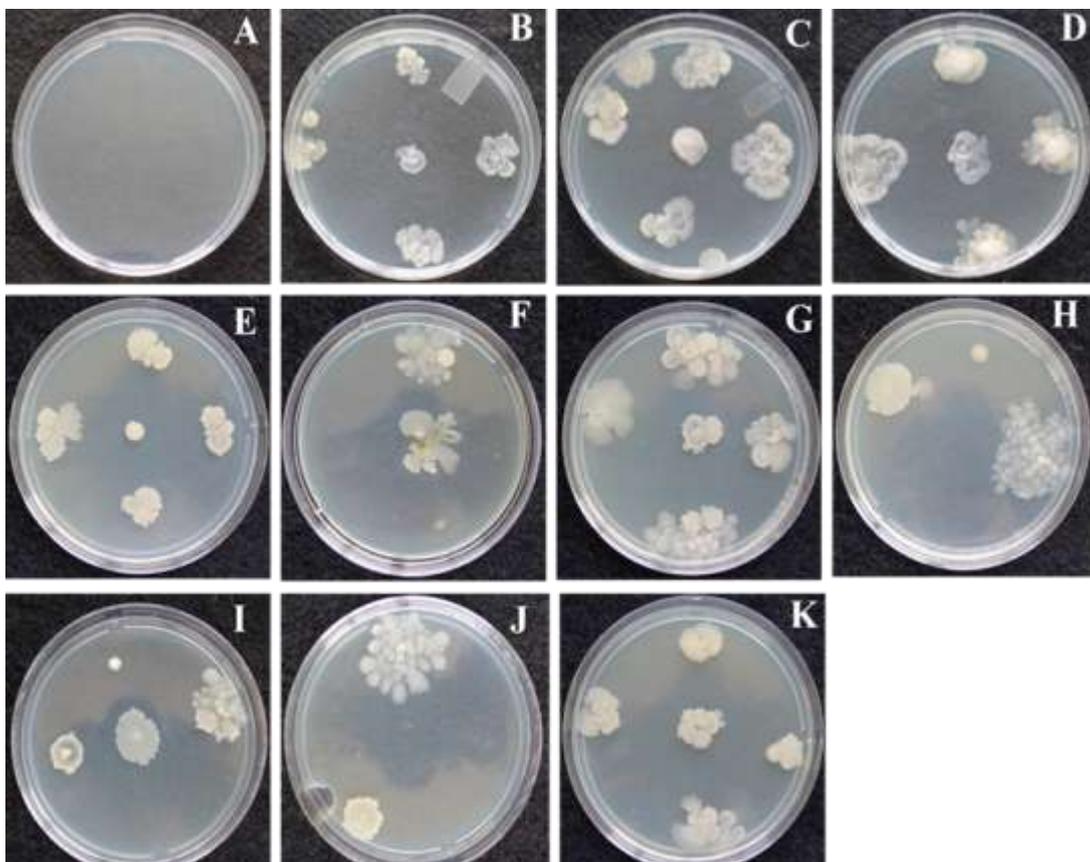
| Tratamento | Emergência ^{NS} | Massa da Parte | | Massa do Sistema | |
|--|--------------------------|---------------------|------|-------------------------|------|
| | | Aérea ^{NS} | | Radicular ^{NS} | |
| | | Fresca | Seca | Fresca | Seca |
| Controle com água | 11,7 | 20,45 | 1,45 | 8,16 | 0,36 |
| Aplicação da mistura de <i>Bacillus</i> no substrato de semeadura | 11,4 | 20,44 | 1,59 | 8,27 | 0,39 |
| Aplicação da mistura de <i>Bacillus</i> no tratamento de sementes | 12,2 | 21,42 | 1,63 | 8,37 | 0,41 |
| Aplicação da mistura de <i>Bacillus</i> sete dias após a semeadura (DAS) | 11,6 | 21,12 | 1,57 | 8,07 | 0,39 |
| Aplicação da mistura de <i>Bacillus</i> no substrato antes da semeadura e nas sementes | 12,5 | 21,76 | 1,69 | 8,76 | 0,38 |
| Aplicações da mistura de <i>Bacillus</i> no substrato antes e sete DAS | 11,7 | 21,86 | 1,59 | 8,09 | 0,38 |
| Aplicação da mistura de <i>Bacillus</i> nas sementes e no substrato sete DAS | 12,4 | 19,99 | 1,51 | 7,63 | 0,36 |
| Aplicação da mistura de <i>Bacillus</i> nas sementes e no substrato antes e sete DAS | 11,2 | 20,72 | 1,59 | 7,84 | 0,37 |

NS=não significativo pelo teste de Scott-Knott 5% de probabilidade.

4.3. Avaliação da presença e quantificação de *B. subtilis* e de *B. licheniformis* nas plantas de tomate

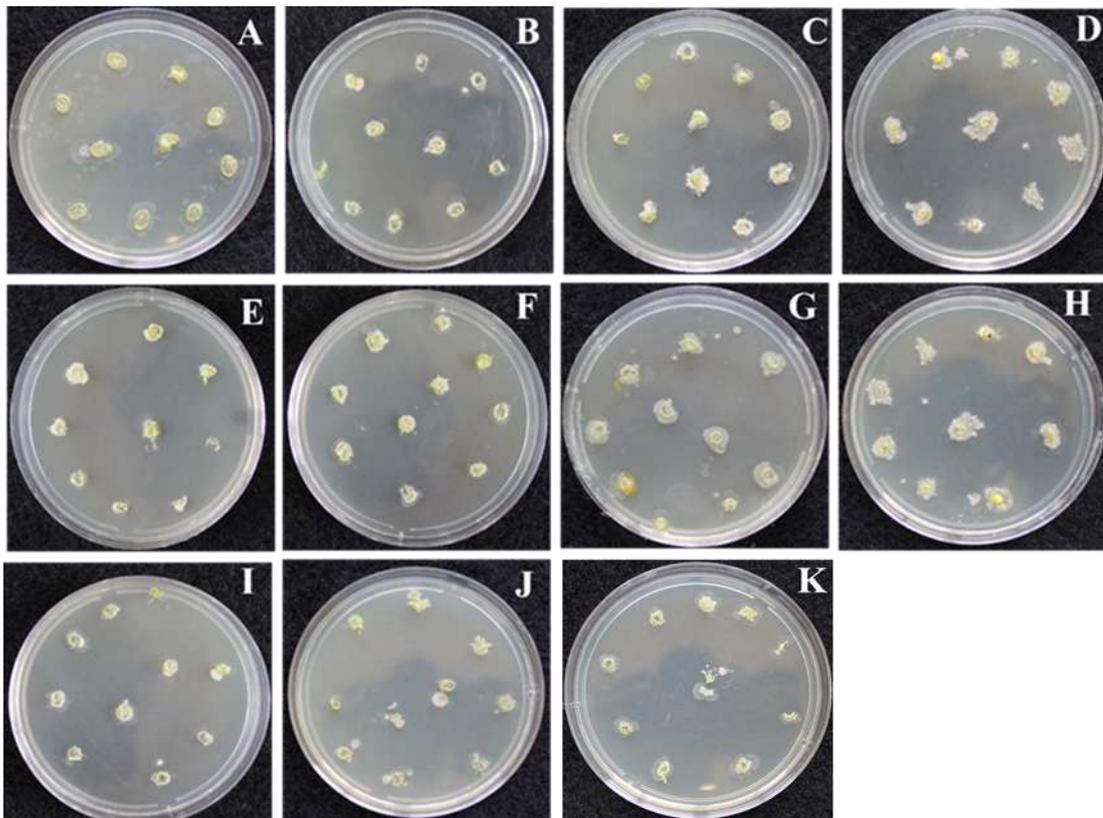
Formação de colônias bacterianas endofíticas morfologicamente semelhantes às colônias dos isolados de *B. subtilis* e de *B. licheniformis* inoculados, de todas as formas e momentos de aplicação, foram observadas em isolamento realizado da seiva exsudada da haste (Figura 4 B-K). Não houve crescimento de colônias bacterianas das plantas que não receberam aplicação da mistura de *B. subtilis* e *B. licheniformis* (Figura 4 A). Os resultados foram semelhantes para o ensaio onde o substrato foi esterilizado.

Figura 4. Colônias de bactérias isoladas da seiva exsudada após o corte transversal da haste principal de tomateiro obtidos de diferentes formas e épocas de aplicação da mistura contendo de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (Quartzo[®]) na concentração 1×10^{10} UFC mL⁻¹. A- controle com água; B - aplicação da mistura de *Bacillus* no substrato de semeadura; C - aplicação da mistura de *Bacillus* nas sementes; D - aplicação da mistura de *Bacillus* no substrato de semeadura e nas sementes; E - aplicação da mistura de *Bacillus* sete dias após o transplante (DAT); F - aplicação da mistura de *Bacillus* no substrato de semeadura e sete DAT; G - aplicação da mistura de *Bacillus* nas sementes e no substrato sete DAT; H – aplicação da mistura de *Bacillus* no substrato de transplante; I - aplicação da mistura de *Bacillus* no substrato de semeadura e no substrato de transplante; J - aplicação da mistura de *Bacillus* nas sementes e no substrato de transplante; K - aplicação da mistura de *Bacillus* no substrato de semeadura, nas sementes, substrato de transplante e sete DAT.



No isolamento de bactérias realizado diretamente da haste das plantas de tomate foi observado crescimento de colônias morfológicamente semelhantes às de *B. subtilis* e *B. licheniformis* aplicadas, nas diversas formas e épocas de inoculação estudadas (Figura 5 B-K). Entretanto, também foi observado crescimento de colônias bacterianas da haste do tratamento controle, isto é, de plantas não tratadas com a mistura de *Bacillus* (Figura 5 A). Esse crescimento também foi observado no ensaio onde o substrato foi esterilizado.

Figura 5. Colônias de bactérias isoladas da haste principal de tomateiro com diferentes formas e épocas de aplicação da mistura de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (Quartzo®) na concentração 1×10^{10} UFC mL⁻¹. A- controle com água; B - aplicação da mistura de *Bacillus* no substrato de semeadura; C - aplicação da mistura de *Bacillus* nas sementes; D - aplicação da mistura de *Bacillus* no substrato de semeadura e nas sementes; E - aplicação da mistura de *Bacillus* sete dias após o transplante (DAT); F - aplicação da mistura de *Bacillus* no substrato de semeadura e sete DAT; G - aplicação da mistura de *Bacillus* nas sementes e no substrato sete DAT; H - aplicação da mistura de *Bacillus* no substrato de transplante; I - aplicação da mistura de *Bacillus* no substrato de semeadura e no substrato de transplante; J - aplicação da mistura de *Bacillus* nas sementes e no substrato de transplante; K - aplicação da mistura de *Bacillus* no substrato de semeadura, nas sementes, substrato de transplante e sete DAT.



Na quantificação de *B. subtilis* e *B. licheniformis* da raiz de plantas de tomate por meio da técnica de qPCR, não foram observadas respostas das diferentes formas e momentos de aplicações realizadas e no número de células bactérias g⁻¹ de raiz de tomateiro. O maior número de células g⁻¹ de raiz foi observado para a aplicação da mistura de *Bacillus* sete dias após o transplante e Aplicação da mistura de *Bacillus* nas sementes e no substrato sete dias após transplantio, com número de células bacterianas de 7,46 x 10⁹ e 8,35 x 10⁹ g⁻¹ de raiz, respectivamente. Os menores números de células foram observados quando a mistura do *B. subtilis* e *B. licheniformis* (Quartzo[®]) foi aplicada no substrato de semeadura (1,78 x 10⁴ g⁻¹ de raiz) e na aplicação no substrato de semeadura e aplicação na semente (9,20 x 10³ g⁻¹ de raiz). Não foi observada a presença de *Bacillus* no controle tratado somente com água (Tabela 2).

Tabela 2. Número de células de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* por grama de raiz determinado pela técnica de PCR quantitativo em tempo real das raízes de tomateiros cujas plantas foram obtidas pela aplicação da mistura de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (Quartzo[®]) na concentração 1 x 10¹⁰ unidades formadoras de colônias (UFC mL⁻¹).

| Tratamento | Células g⁻¹ de raiz |
|---|---------------------------------------|
| Controle com água | 0 |
| Aplicação da mistura de <i>Bacillus</i> no substrato de semeadura | 1,78 x 10 ⁴ |
| Aplicação da mistura de <i>Bacillus</i> nas sementes | 1,17 x 10 ⁶ |
| Aplicação da mistura de <i>Bacillus</i> no substrato de semeadura e nas sementes | 9,20 x 10 ³ |
| Aplicação da mistura de <i>Bacillus</i> sete dias após o transplante (DAT); | 7,46 x 10 ⁹ |
| Aplicação da mistura de <i>Bacillus</i> no substrato de semeadura e sete DAT | 3,56 x 10 ⁶ |
| Aplicação da mistura de <i>Bacillus</i> nas sementes e no substrato sete DAT | 8,35 x 10 ⁹ |
| Aplicação da mistura de <i>Bacillus</i> no substrato de transplante | 3,47 x 10 ⁶ |
| Aplicação da mistura de <i>Bacillus</i> no substrato de semeadura e no substrato de transplante | 7,41 x 10 ⁵ |
| Aplicação da mistura de <i>Bacillus</i> nas sementes e no substrato de transplante | 5,60 x 10 ⁶ |
| Aplicação da mistura de <i>Bacillus</i> no substrato de semeadura, nas sementes, substrato de transplante e sete DAT. | 2,03 x 10 ⁶ |

Na quantificação das bactérias totais presentes na região da rizosfera das plantas de tomate após a aplicação da mistura de *B. subtilis* e *B. licheniformis* foram observadas concentrações variando de 2×10^5 a 6×10^7 UFC g^{-1} de rizosfera. A maior concentração foi observada para a aplicação da mistura de *B. subtilis* e *B. licheniformis* no substrato de semeadura e sete dias após o transplântio, sendo esta concentração de 6×10^7 UFC g^{-1} rizosfera. As aplicações da mistura de *B. subtilis* e *B. licheniformis* no substrato de semeadura e a aplicação nas sementes não diferiram estatisticamente do controle não inoculado, apresentando concentrações de $2,8 \times 10^6$ e $4,0 \times 10^5$ UFC g^{-1} rizosfera, respectivamente. Nas demais técnicas de aplicação da mistura dos *Bacillus* foram observadas concentrações em torno de 1×10^7 UFC g^{-1} de rizosfera de tomate (Tabela 3).

Tabela 3. Unidades Formadoras de Colônias de bactérias por grama de rizosfera de tomateiros obtidos por diferentes formas e momento de aplicação da mistura de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (Quartzo[®]) na concentração 1×10^{10} UFC mL⁻¹

| Tratamento | UFC g⁻¹ de rizosfera de tomateiro |
|--|---|
| Controle com água | 2,0 x 10 ⁵ c |
| Aplicação da mistura de <i>Bacillus</i> no substrato de semeadura | 2,8 x 10 ⁶ c |
| Aplicação da mistura de <i>Bacillus</i> nas sementes | 4,0 x 10 ⁵ c |
| Aplicação da mistura de <i>Bacillus</i> no substrato de semeadura e nas sementes | 5,0 x 10 ⁷ a |
| Aplicação da mistura de <i>Bacillus</i> sete dias após o transplante (DAT) | 5,0 x 10 ⁷ a |
| Aplicação da mistura de <i>Bacillus</i> no substrato de semeadura e sete DAT | 6,0 x 10 ⁷ a |
| Aplicação da mistura de <i>Bacillus</i> nas sementes e no substrato sete DAT | 3,0 x 10 ⁷ b |
| Aplicação da mistura de <i>Bacillus</i> no substrato de transplante | 5,7 x 10 ⁷ a |
| Aplicação da mistura de <i>Bacillus</i> no substrato de semeadura e no substrato de transplante | 5,8 x 10 ⁷ a |
| Aplicação da mistura de <i>Bacillus</i> nas sementes e no substrato de transplante | 5,9 x 10 ⁷ a |
| Aplicação da mistura de <i>Bacillus</i> no substrato de semeadura, nas sementes, substrato de transplante e sete DAT | 6,0 x 10 ⁷ a |
| C.V. (%) | 29,05 % |

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott 5% de probabilidade.

4.4. Efeito de *B. subtilis* e de *B. licheniformis* aplicados em mistura ou separadamente na promoção de crescimento de plantas de tomate desenvolvidas em rizotron

A massa fresca do sistema radicular, as massas secas da parte aérea e do sistema radicular, o volume do sistema radicular, bem como o comprimento da raiz aumentaram significativamente ($p < 0,05$), em relação à testemunha, com a aplicação da mistura de *B. subtilis* e *B. licheniformis* nas concentrações 1×10^8 , 1×10^9 e 1×10^{10} UFC mL⁻¹ e também com a aplicação de *B. subtilis* e *B. licheniformis* individualmente na concentração 1×10^8 UFC mL⁻¹ (Figura 6 e 7).

A aplicação da mistura de *B. subtilis* e *B. licheniformis* (Quartzo[®]), em todas as concentrações estudadas, bem como a aplicação dos isolados de *Bacillus subtilis* e *B. licheniformis* separadamente, na concentração de 1×10^8 UFC mL⁻¹, incrementou as massas frescas e secas do sistema radicular. Para a aplicação da mistura de *B. subtilis* e *B. licheniformis* (Quartzo[®]) na concentração de 1×10^{10} UFC mL⁻¹, foram observados incrementos de 155,32% e 279,75% superiores ao controle não inoculado para massa fresca e seca, respectivamente (Tabela 4). O volume do sistema radicular e o comprimento da raiz foram incrementados em 141,38% e 43,99% respectivamente, com a aplicação da mistura de *B. subtilis* e *B. licheniformis* (Quartzo[®]), na concentração de 1×10^{10} UFC mL⁻¹, em relação ao controle. As massas frescas da parte aérea não diferiram entre si, enquanto que nas secas foram observados aumentos quando comparadas ao controle não inoculado de 74,92 % para a aplicação de *B. licheniformis* na concentração de 1×10^8 UFC mL⁻¹ (Tabela 4).

A aplicação da mistura de *B. subtilis* e *B. licheniformis* (Quartzo[®]) nas concentrações 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} UFC mL⁻¹, bem como a aplicação separada das cepas componentes do produto comercial Quartzo[®] na concentração 1×10^8 UFC mL⁻¹, não incrementaram significativamente a altura (variando de 56,6 cm a 69,4 cm), o diâmetro do caule das plantas (variando de 8,33 mm a 9,92 mm) e o teor de clorofila das plantas.

Figura 6. Volume da raiz (A), comprimento da raiz (B), massas fresca (C) e seca (D) do sistema radicular e massa seca da parte aérea (E) de plantas tomate tratadas com a mistura de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (Quartzo[®]) nas concentrações de 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} UFC mL⁻¹; com *B. subtilis* (BS) e *B. licheniformis* (BL), separadamente, na concentração de 1×10^8 UFC mL⁻¹ e controle (CA) desenvolvidas em rizotrons. Medias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott- Knott, 5 % de probabilidade. Barras de erros representam o desvio padrão.

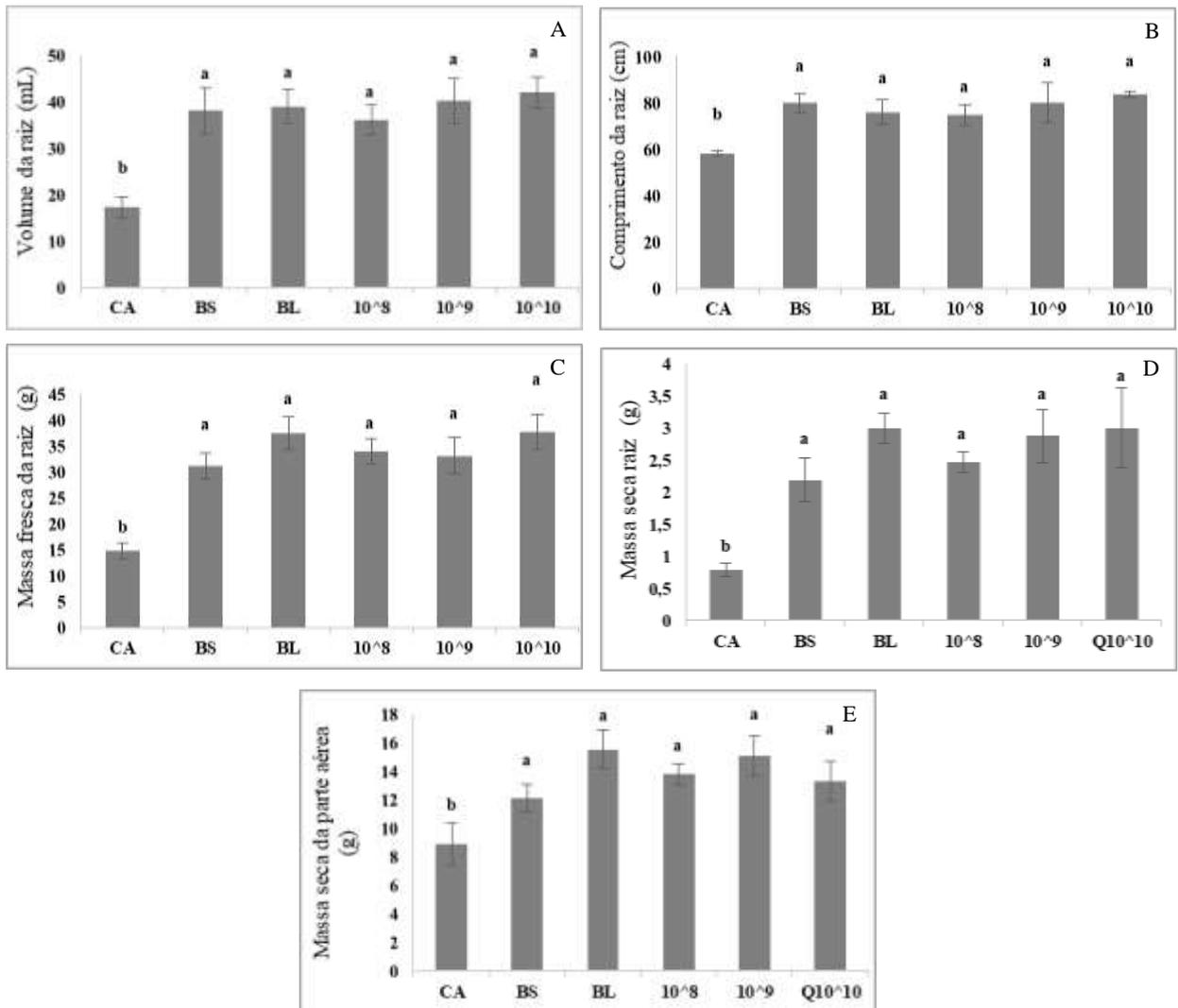


Figura 7. Tomateiros desenvolvidas em rizotron originários de plantas tratadas com a mistura de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (Quartzo®) nas concentrações 0, 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} UFC mL⁻¹, *B. subtilis* (BS) e *B. licheniformis* (BL), separadamente, na concentração de 1×10^8 UFC mL⁻¹ e controle (CA).



Tabela 4. Porcentagem de incremento, em relação ao controle não inoculado, das variáveis relacionadas ao desenvolvimento de tomateiro cultivado em rizotrons após a aplicação mistura de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* nas concentrações 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} e aplicação separada de *B. subtilis* (BS) e *B. licheniformis* (BL) na concentração 1×10^8 UFC mL⁻¹.

| Tratamento | Volume do Sistema Radicular | Comprimento da Raiz | Massa do Sistema Radicular | | Massa Seca da Parte Aérea |
|---|-----------------------------|---------------------|----------------------------|--------|---------------------------|
| | | | Fresca | Seca | |
| BS | 118,39 | 37,11 | 111,19 | 177,22 | 36,30 |
| BL | 124,14 | 30,58 | 153,56 | 278,48 | 74,92 |
| 1×10^8 UFC mL ⁻¹ | 106,90 | 28,44 | 130,03 | 212,66 | 54,96 |
| 1×10^9 UFC mL ⁻¹ | 131,03 | 37,46 | 124,41 | 263,29 | 69,61 |
| 1×10^{10} UFC mL ⁻¹ | 141,38 | 43,99 | 155,32 | 279,75 | 49,74 |

4.5. Controle da murcha de *Fusarium* com *Bacillus*

4.5.1. Efeito da mistura de *B. subtilis* e *B. licheniformis* (Quartzo[®]) no controle da murcha de *Fusarium* do tomateiro

A aplicação da mistura de *B. subtilis* e *B. licheniformis* (Quartzo[®]), nos dois ensaios, na concentração de 1×10^{10} UFC mL⁻¹, não reduziu ($p < 0,05$) a severidade da murcha do tomateiro. Ao contrário, aumentando o número de aplicações foi observado um aumento da severidade da doença (Tabela 5). Para esses ensaios foram realizadas análises dos dados de severidade tanto considerando todas as plantas, como somente as plantas doentes, isto é, foram excluídas as que não apresentaram sintomas da murcha de *Fusarium*, pois possivelmente ocorreu escape. Esta análise apresentou a mesma tendência de quando foi realizada análise estatística com todas as plantas (Tabela 5).

De um modo geral, a aplicação da mistura de *B. subtilis* e *B. licheniformis* (Quartzo[®]), nos dois ensaios, na concentração de 1×10^{10} UFC mL⁻¹, não alteraram as massas frescas da parte aérea e do sistema radicular das plantas de tomate desenvolvidas em substrato infestado com FOL (Figura 8AB). O maior número de aplicações da mistura de *B. subtilis* e *B. licheniformis* nas plantas (MS, MS10 e MS1020) reduziu as massas frescas da parte aérea (Figura 8A) e do sistema radicular (Figura 8B). Não foram observadas diferenças entre os tratamentos para as variáveis altura, diâmetro da haste e teor de clorofila (dados não apresentados). A altura das plantas no primeiro ensaio variou de 93,41 cm a 107,58 cm e no segundo de 66,95 cm a 78,83 cm, sendo que o diâmetro variou de 6,58 mm a 7,58 mm no primeiro e de 7,34 mm a 8,91 mm no segundo ensaio.

Diferenças na composição de macro e micronutrientes do limbo foliar do tomateiro cultivados com a aplicação da mistura de *B. subtilis* e *B. licheniformis* não foram observadas entre os tratamentos (Tabela 6). Entretanto, chama a atenção que os teores de K, Ca, S e Fe nas plantas que receberam a mistura de *B. subtilis* e *B. licheniformis* foram sempre superiores às plantas não tratadas.

A presença de *Fusarium* nas plantas com murcha foi confirmada pelo reisolamento patógeno (Figura 9).

Tabela 5. Severidade (área abaixo da curva do progresso da doença – AACPD) e sintomas internos (notas de 1 a 6) da murcha de *Fusarium* em plantas de tomate cultivadas em solo infestado com *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3 (FOL), submetidas à aplicação da mistura de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*, na concentração de 1×10^{10} UFC mL⁻¹, nas mudas (M); no substrato de transplantio (S); nas mudas e no substrato de transplantio (MS); nas mudas, no substrato de transplantio e 10 dias após o transplante (MS10) e aplicação nas mudas, no substrato de transplantio e 10 e 20 dias após o transplante (MS1020).

| Tratamento ⁽²⁾ | Ensaio 1 | | Ensaio 2 | |
|--|----------------------|---------------------------------|----------------------|---------------------------------|
| | AACPD ⁽¹⁾ | Sintomas Interno ⁽¹⁾ | AACPD ⁽¹⁾ | Sintomas Interno ⁽¹⁾ |
| Médias considerando todas as plantas | | | | |
| FOL | 56,41a | 3,25a | 65,04a | 3,58a |
| M | 59,75a | 4,38b | 81,66b | 4,50b |
| S | 66,29a | 4,75b | 87,21b | 4,33b |
| MS | 77,63b | 4,63b | 77,86b | 4,75b |
| MS10 | 80,41b | 5,41c | 79,63b | 4,54b |
| MS1020 | 78,33b | 4,83b | 85,02b | 4,66b |
| C.V. (%) | 30,36 | 29,28 | 24,49 | 23,75 |
| Médias considerando apenas as plantas doentes | | | | |
| FOL | 63,50a | 4,37a | 66,86a | 4,26 |
| M | 63,14a | 4,85b | 81,66b | 4,50 |
| S | 69,04a | 5,09b | 87,02b | 4,33 |
| MS | 83,47b | 5,14b | 77,87b | 4,75 |
| MS10 | 80,41b | 5,54b | 79,62b | 4,54 |
| MS1020 | 79,95b | 5,00b | 86,28b | 4,82 |
| C. V. (%) | 13,99 | 15,54 | 24,20 | 18,32 |

¹. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, 5 % de probabilidade. Os dados da AACPD foram transformados em raiz quadrada de x para análise estatística.

Figura 8. Massa fresca e seca da parte aérea (A) e do sistema radicular (B) de plantas de tomate cultivadas em solo infestado com *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3 (FOL), submetidas à aplicação da mistura de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*, na concentração de 1×10^{10} UFC mL⁻¹, nas mudas (M); no substrato de transplantio (S); nas mudas e no substrato de transplantio (MS); nas mudas, no substrato de transplantio e 10 dias após o transplante (MS10) e aplicação nas mudas, no substrato de transplantio e 10 e 20 dias após o transplante (MS1020). Médias seguidas de mesma letra

não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, 5 % de probabilidade. Barras de erros representam o desvio padrão.

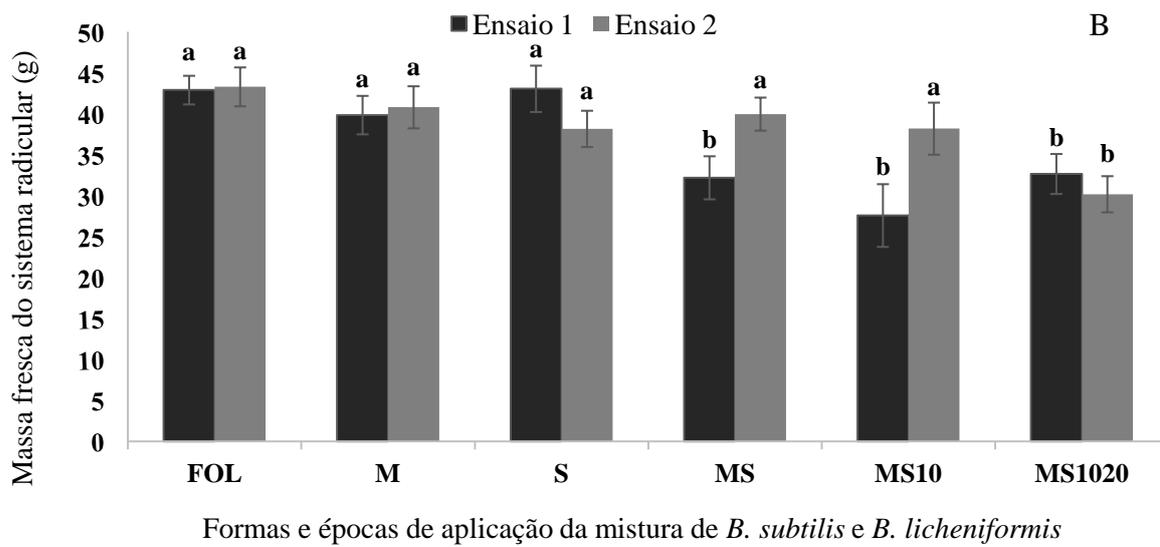
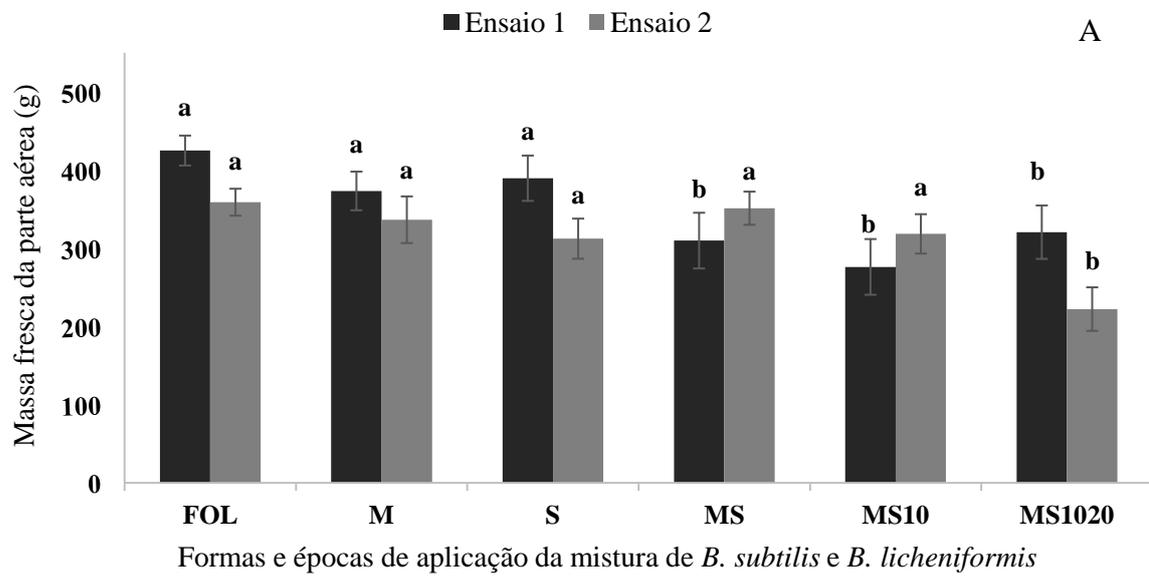
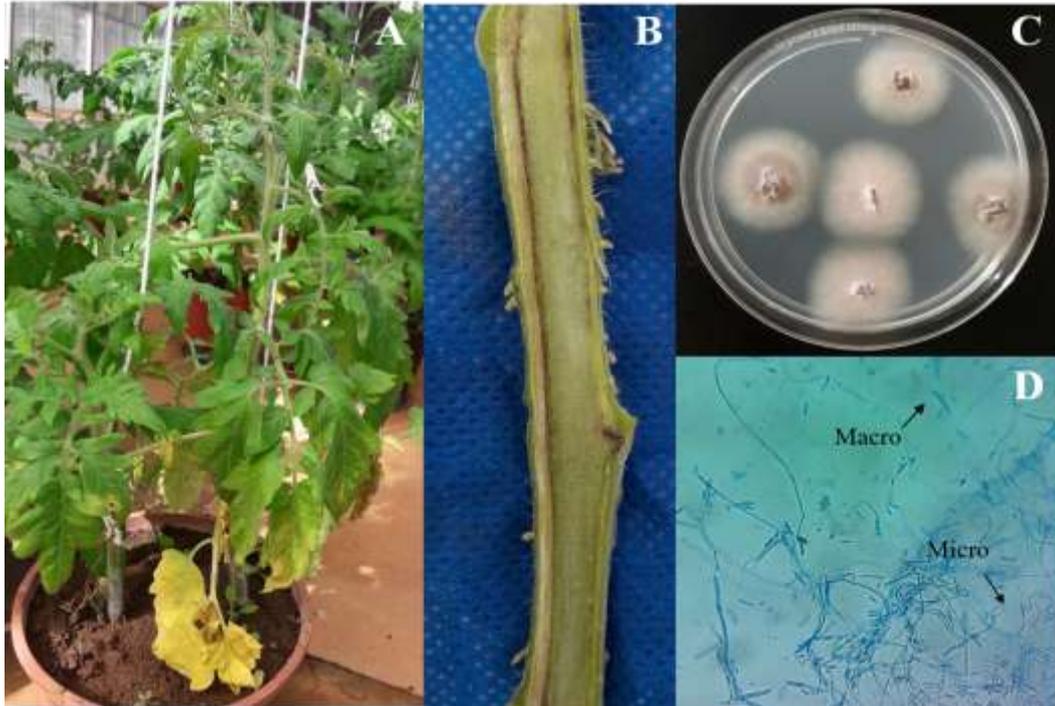


Tabela 6. Composição de macro e micronutrientes do limbo foliar de tomateiro tratados com a mistura de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* na concentração de 1×10^{10} UFC mL⁻¹ e cultivados em solo infestado com *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3 (FOL). Dados do primeiro ensaio.

| Tratamento | N | P | K | Ca | Mg | S | Mn | Zn | B | Cu | Fe |
|--------------------|------|-----|------|------|------|---------------------|-------|------|------|-----|--------|
| g kg ⁻¹ | | | | | | mg kg ⁻¹ | | | | | |
| CA ¹ | 28,4 | 5,2 | 16,8 | 19,3 | 7,8 | 4,5 | 119,5 | 24,7 | 12,5 | 2,8 | 289,7 |
| FOL | 34,2 | 5,6 | 18,2 | 25,2 | 8,3 | 4,8 | 52,6 | 36,3 | 20,5 | 5,6 | 1590,4 |
| M | 30,3 | 4,3 | 23,0 | 29,1 | 8,1 | 12,6 | 67,3 | 24,9 | 21,9 | 5,1 | 2914,8 |
| S | 34,6 | 4,3 | 20,1 | 32,5 | 8,0 | 12,2 | 63,3 | 20,6 | 20,0 | 3,8 | 1361,2 |
| MS | 30,1 | 5,3 | 24,5 | 33,2 | 9,1 | 13,2 | 80,5 | 31,6 | 24,0 | 6,0 | 2417,4 |
| MS10 | 31,3 | 5,3 | 19,9 | 33,3 | 9,7 | 13,6 | 68,2 | 20,5 | 22,7 | 4,7 | 1721,2 |
| MS1020 | 27,5 | 7,2 | 27,8 | 35,6 | 10,0 | 17,1 | 65,6 | 21,2 | 22,1 | 6,4 | 1585,2 |

¹CA = Controle absoluto; FOL = solo infestado com FOL raça 3; M = mistura de *B. subtilis* e *B. licheniformis* aplicada nas mudas; S = mistura de *B. subtilis* e *B. licheniformis* aplicada no substrato de transplantio; MS = mistura de *B. subtilis* e *B. licheniformis* aplicada nas mudas e no substrato de transplantio; MS10 = mistura de *B. subtilis* e *B. licheniformis* aplicada nas mudas, no substrato de transplantio e 10 dias após o transplante; MS1020 = mistura de *B. subtilis* e *B. licheniformis* aplicada nas mudas, no substrato de transplantio e 10 e 20 dias após o transplante.

Figura 9. Planta com sintoma externo da murcha de Fusarium (A), haste com sintoma interno da murcha de Fusarium (B), colônias de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* obtida a partir de fragmentos da haste de plantas de tomate cultivadas em solo infestado com o patógeno e tratadas com aplicação da mistura de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* na concentração de 1×10^{10} UFC mL⁻¹ (C), macro e microconídios de *Fusarium* (D).



4.5.2. Controle da murcha de *Fusarium* utilizando as cepas de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* aplicadas separadamente nas plantas de tomate

A aplicação do isolado de *B. licheniformis*, separadamente, na concentração de 1×10^8 UFC mL⁻¹, reduziu ($p < 0,05$) a AACPD da murcha do tomateiro (Tabela 7). Por outro lado, para o isolado de *B. subtilis*, separadamente, somente a aplicação nas mudas e nas mudas e no substrato 10 e 20 DAT reduziram a AACPD (Tabela 7). Também foi analisado o efeito das aplicações considerando apenas as plantas doentes (Tabela 7), para tanto, foram excluídas da análise as plantas que, mesmo sendo cultivadas no mesmo vaso de uma doente, não apresentaram sintomas da murcha de *Fusarium*. Esta análise apresenta praticamente a mesma tendência de quando foi realizada análise estatística com todas as plantas (Tabela 7). Para os sintomas internos não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos, tanto considerando o total das plantas, como somente as com sintomas da murcha de *Fusarium* (Tabela 7).

A aplicação *Bacillus subtilis* e *B. licheniformis* individualmente na concentração de 1×10^8 UFC mL⁻¹ não apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) no desenvolvimento do tomateiro para as massas frescas da parte aérea e do sistema radicular (Tabela 8).

Todas as formas e épocas de aplicação das cepas de *B. subtilis* e *B. licheniformis*, quando comparadas ao controle infestado com FOL raça 3, incrementaram a massa fresca da parte aérea, exceto para a aplicação de *B. subtilis* no substrato de transplântio (BSS) que apresentou uma redução 8,72%. O maior incremento ocorreu para *B. licheniformis* aplicado no substrato de transplante (BLS) com um aumento de 20,7% e 29,9%, para a parte aérea e o sistema radicular, respectivamente (Tabela 8).

A aplicação de *B. subtilis* e *B. licheniformis* separadamente não promoveu o aumento das variáveis altura (variando de 103,20 cm a 117,20 cm), diâmetro da base da haste (variando de 8,27 mm a 8,80 mm) e teor de clorofila (dados não mostrados).

Diferenças na composição de macro e micronutrientes do limbo foliar do tomateiro cultivados com a aplicação dos isolados de *B. subtilis* e *B. licheniformis* separadamente não foram observadas entre os tratamentos (Tabela 9).

Tabela 7. Severidade (área abaixo da curva do progresso da doença – AACPD) e sintomas internos (notas de 1 a 6) da murcha de *Fusarium* em plantas de tomate cultivadas em solo infestado com *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3 (FOL), submetidas à aplicação de *Bacillus subtilis* (BS) e *Bacillus licheniformis* (BL), separadamente, na concentração de 1×10^8 UFC mL⁻¹, nas mudas (M); no substrato de transplantio (S); nas mudas e no substrato de transplantio (MS); nas mudas, no substrato de transplantio e 10 dias após o transplante (MS10) e aplicação nas mudas, no substrato de transplantio e 10 e 20 dias após o transplante (MS1020).

| Tratamento | AACPD | Sintoma Interno ^{ns} | AACPD | Sintoma Interno ^{ns} |
|------------|--------------------------------------|-------------------------------|---|-------------------------------|
| | Médias considerando todas as plantas | | Médias considerando apenas as plantas doentes | |
| FOL | 112,85b | 4,20 | 120,83b | 4,76 |
| BLM | 96,67a | 4,25 | 101,53a | 4,61 |
| BLS | 80,47a | 4,50 | 80,47a | 4,50 |
| BLMS | 92,55a | 4,55 | 92,55a | 4,55 |
| BLMS10 | 99,22a | 3,95 | 106,67b | 4,47 |
| BLMS1020 | 88,40a | 4,30 | 90,47a | 4,47 |
| BSM | 95,45a | 4,25 | 96,03a | 4,61 |
| BSS | 124,07b | 4,70 | 124,07b | 4,70 |
| BSMS | 102,67b | 4,35 | 105,50b | 4,53 |
| BSMS10 | 104,35b | 4,30 | 107,26b | 4,47 |
| BSMS1020 | 97,27a | 4,60 | 97,27a | 4,60 |
| C.V. (%) | 17,12 | 15,07 | 32,16 | 16,21 |

¹Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Scott-Knott, 5 % de probabilidade. Os dados da AACPD foram transformados em raiz quadrada de x para análise estatística.

^{ns} Não significativo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Tabela 8. Massas frescas da parte aérea e do sistema radicular (g) de plantas de tomate cultivadas em solo infestado com *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3 (FOL), submetidas à aplicação de *Bacillus subtilis* (BS) e *Bacillus licheniformis* (BL), separadamente, na concentração de 1×10^8 UFC mL⁻¹, nas mudas (M); no substrato de transplantio (S); nas mudas e no substrato de transplantio (MS); nas mudas, no substrato de transplantio e 10 dias após o transplante (MS10) e aplicação nas mudas, no substrato de transplantio e 10 e 20 dias após o transplante (MS1020).

| Tratamentos | Parte aérea | Sistema radicular | Incremento parte aérea | Incremento sistema radicular |
|--------------------|--------------------|--------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|
| FOL | 412,9 | 39,81 | - | - |
| BLM | 484,7 | 43,38 | 17,4 | 8,9 |
| BLS | 498,5 | 50,81 | 20,7 | 29,9 |
| BLMS | 461,8 | 43,67 | 11,8 | 9,7 |
| BLMS10 | 470,6 | 50,34 | 13,9 | 26,4 |
| BLMS1020 | 471,1 | 44,95 | 14,1 | 12,9 |
| BSM | 468,4 | 46,26 | 13,4 | 13,9 |
| BSS | 376,6 | 36,07 | - | - |
| BSMS | 451,1 | 45,12 | 9,2 | 13,3 |
| BSMS10 | 481,0 | 49,13 | 16,7 | 25,4 |
| BSMS1020 | 457,6 | 46,31 | 10,8 | 16,3 |
| C. V. (%) | 18,51% | 28,8 | - | - |

^{ns}Não significativo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

Tabela 9. Composição de macro e micronutrientes do limbo foliar de tomateiro tratados com células dos isolados de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* aplicados individualmente na concentração de 1×10^8 UFC mL⁻¹ e cultivadas em solo infestado com *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3 (FOL). Dados do primeiro ensaio.

| Tratamentos | N | P | g kg ⁻¹ | | | | mg kg ⁻¹ | | | | |
|-----------------|------|-----|--------------------|------|------|------|---------------------|------|------|------|--------|
| | | | K | Ca | Mg | S | Mn | Zn | B | Cu | Fe |
| CA ¹ | 35,0 | 4,7 | 20,4 | 21,9 | 7,0 | 11,3 | 105,7 | 33,1 | 15,8 | 3,7 | 365,2 |
| FOL | 35,0 | 4,3 | 23,1 | 28,2 | 7,8 | 13,6 | 51,4 | 33,4 | 21,6 | 6,8 | 468,2 |
| BLM | 37,0 | 4,5 | 22,1 | 25,7 | 9,1 | 5,8 | 38,1 | 28,2 | 12,8 | 3,9 | 316,0 |
| BLS | 32,5 | 5,0 | 17,5 | 27,5 | 9,6 | 5,9 | 39,4 | 29,4 | 16,0 | 3,5 | 378,8 |
| BLMS | 31,9 | 5,1 | 14,3 | 28,6 | 8,9 | 5,8 | 37,2 | 40,1 | 17,9 | 3,2 | 333,2 |
| BLMS10 | 38,9 | 6,9 | 22,2 | 33,4 | 11,5 | 6,7 | 57,2 | 43,7 | 25,6 | 7,0 | 1784,2 |
| BLMS1020 | 36,5 | 5,7 | 19,1 | 27,3 | 9,4 | 6,4 | 42,5 | 43,3 | 15,8 | 5,2 | 361,0 |
| BSM | 35,6 | 6,0 | 22,5 | 32,5 | 11,7 | 7,0 | 47,0 | 29,9 | 17,4 | 5,5 | 720,8 |
| BSS | 35,0 | 8,3 | 21,6 | 25,7 | 9,7 | 4,9 | 52,2 | 34,3 | 38,4 | 25,7 | 1035,4 |
| BSMS | 41,1 | 4,9 | 25,0 | 28,9 | 10,9 | 5,6 | 4,04 | 22,4 | 14,1 | 4,0 | 466,3 |
| BSMS10 | 36,5 | 5,9 | 19,5 | 26,4 | 9,1 | 6,1 | 41,7 | 33,5 | 18,9 | 4,1 | 367,9 |
| BSMS1020 | 38,5 | 6,1 | 20,1 | 26,8 | 9,4 | 6,0 | 42,6 | 32,4 | 18,1 | 4,8 | 859,1 |

¹CA = Controle absoluto; FOL = solo infestado com FOL raça 3; BLS = *B. licheniformis* aplicado no substrato de transplantio; BLMS = *B. licheniformis* aplicado nas mudas e no substrato de transplantio; BLMS10 = *B. licheniformis* aplicado nas mudas, no substrato de transplantio e 10 dias após o transplante; BLMS1020 = *B. licheniformis* aplicado nas mudas, no substrato de transplantio e 10 e 20 dias após o transplante; BSM = *B. subtilis* aplicado nas mudas; BSS = *B. subtilis* aplicado no substrato de transplantio; BSMS = *B. subtilis* aplicado nas mudas e no substrato de transplantio; BSMS10 = *B. subtilis* aplicado nas mudas, no substrato de transplantio e 10 dias após o transplante; BSMS1020 = *B. subtilis* aplicado nas mudas, no substrato de transplantio e 10 e 20 dias após o transplante.

4.5.3. Efeito da concentração da mistura *B. subtilis* e *B. licheniformis* e das cepas separadamente no controle da murcha do tomateiro

Analisando a severidade das plantas tratadas com a mistura de *B. subtilis* e *B. licheniformis* nas concentrações de 0, 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 e 1×10^{10} UFC mL⁻¹, aplicada no substrato de produção de mudas e no substrato de transplântio, foi verificada uma resposta quadrática com ponto de inflexão em 1×10^8 UFC mL⁻¹ ($y = 0,15x^2 - 1,2329x + 5,24$; $R^2 = 0,6362$). A maior redução dos sintomas internos ocorreu para a concentração de 1×10^8 UFC mL⁻¹ (Figura 10). Por outro lado, analisando os efeitos dos isolados de *B. subtilis* e *B. licheniformis*, aplicados em mistura ou separadamente, na concentração de 1×10^8 UFC mL⁻¹, foi verificado que a aplicação da mistura dos isolados de *Bacillus* e aplicação de *B. subtilis* separadamente reduziram significativamente a severidade interna da murcha de Fusarium (Figura 11), enquanto que o isolado de *B. licheniformis* não reduziu a severidade interna.

Figura 10. Efeito da aplicação nas mudas e no substrato de transplante da mistura contendo *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (Quartzo®) nas concentrações de 0, 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 e 1×10^{10} UFC mL⁻¹ sobre a severidade interna da murcha de *Fusarium* de tomateiro cultivados em solo infestado com *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3.

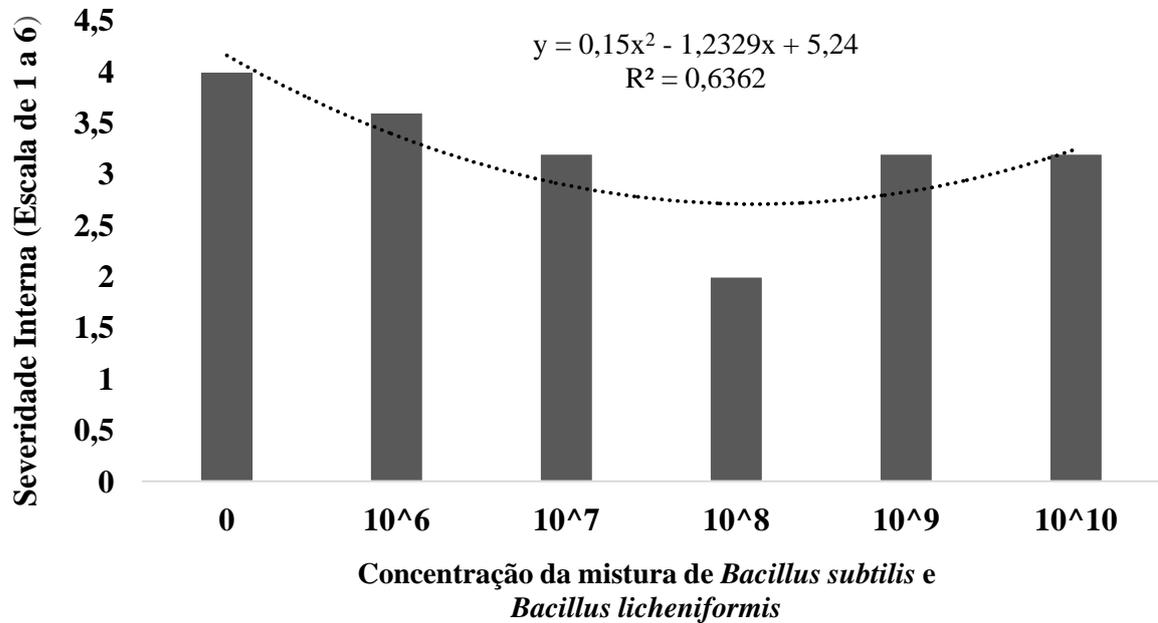
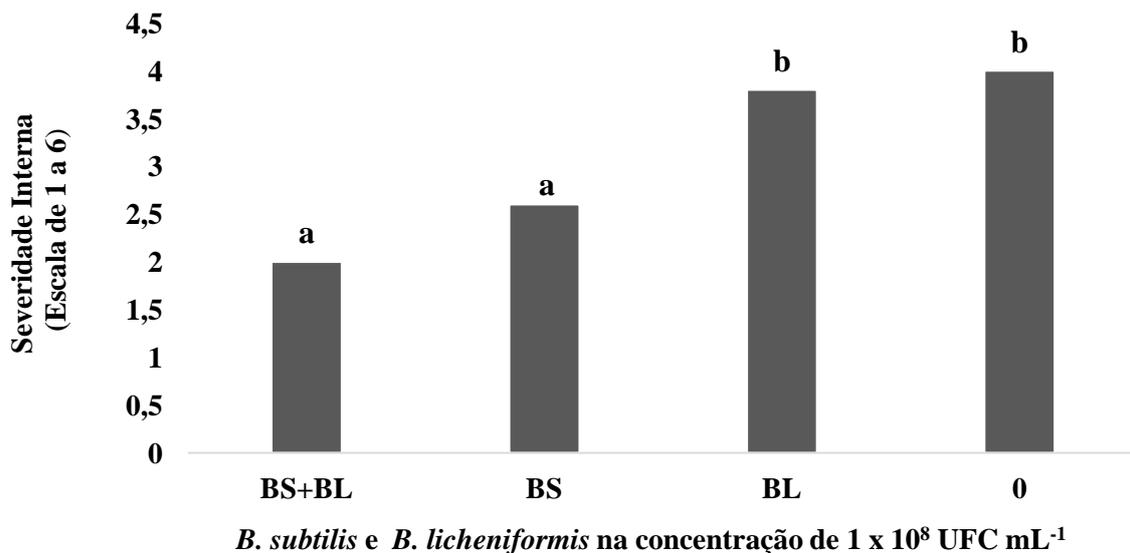


Figura 11. Efeito da aplicação nas mudas e no substrato de transplante da mistura contendo *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (Quartzo®) (BS + BL) e dos isolados de *B. subtilis* (BS) e de *B. licheniformis* (BL), separadamente, na concentração de 1×10^8 UFC mL⁻¹ sobre a severidade interna da murcha de *Fusarium* de tomateiro cultivados em solo infestado com *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3.



5. DISCUSSÃO

No presente estudo foi investigada a ação de *B. subtilis* e *B. licheniformis*, aplicados em mistura formulada e separadamente, na promoção de crescimento e no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) raça 3 do tomateiro em ambiente controlado. A exploração de bactérias, especialmente do gênero *Bacillus*, como potencial agente na promoção de crescimento e para o controle da murcha de *Fusarium* foi relatada por Fira et al. (2018); Jangir et al. (2018); Bhattacharya et al. (2019) e Cui et al. (2019).

De acordo com os testes *in vitro* e *in vivo*, a aplicação de *B. subtilis* e *B. licheniformis* aumentou o desenvolvimento das plantas de tomate (Figuras 1, 2, 6 e 7, Tabela 4). Relatos similares, que comprovam a eficiência do gênero *Bacillus* como promotor de crescimento, são disponíveis na literatura (ADREES et al., 2018; SUKKASEM et al., 2018; BHATTACHARYA et al., 2019 e CUI et al., 2019). A promoção de crescimento observada pode estar relacionada à melhoria na absorção de nutrientes e água e na produção de fitohormônios. O maior crescimento radicular (Figuras 2, 6 e 7) pode ser explicado pelo aumento da produção de ácido indolacético que exerce efeito sobre o crescimento radicular, induzindo raízes mais longas e aumentando a biomassa do sistema radicular e a melhora na nutrição das plantas. As espécies de *Bacillus* utilizadas no presente estudo são relatadas como produtoras de sideróforos, solubilizadoras de fosfatos, fixadoras de nitrogênio e produtoras de ácido cianídrico (PII et al., 2015; ABDALLAH et al., 2018; SUKKASEM et al., 2018; BHATTACHARYA et al., 2019; CUI et al., 2019). Sukkasem et al. (2018) também observaram múltiplos efeitos da inoculação de *B. licheniformis* na promoção de crescimento e no aumento do desenvolvimento radicular em *Arabidopsis*. Em tomate, Ramavath et al. (2019) observaram maior crescimento radicular e da parte aérea e acúmulo da massa seca de 47 %, quando *B. subtilis* foi inoculado na semente. Singh et al. (2019) verificaram que a cepa de *B. subtilis* SF48 aumentou a germinação e a emergência das plantas, além de promover o crescimento de *Helianthus annuus*.

A eficiência de *Bacillus* na promoção de crescimento de plantas está correlacionada a diferentes mecanismos de ação. Dessa maneira, a avaliação dos mecanismos é importante para determinar o potencial da cepa no desenvolvimento da planta, seja pela produção de um fitohormônio ou por disponibilizar algum nutriente para seu crescimento. Para a continuidade do trabalho, o entendimento de quais mecanismos *Bacillus* utiliza para promover o crescimento de plantas de tomate é importante. Portanto, a avaliação da produção de ácido indolacético, a solubilização de fosfato e a fixação de nitrogênio pelos isolados devem ser

realizadas, bem como a avaliação desses nutrientes na planta com a aplicação dos *Bacillus*, em consórcio ou individuais. Um fato importante observado no presente estudo foi a presença dos isolados de *B. subtilis* e de *B. licheniformis* tanto na rizosfera como na seiva das plantas tratadas (Tabelas 2 e 3; Figuras 4 e 5), indicando a sobrevivência nas plantas.

Em relação ao controle da murcha de Fusarium os resultados são contraditórios entre os experimentos desenvolvidos (Tabelas 5 e 7; Figuras 10 e 11). No experimento onde foram estudadas as concentrações de *Bacillus* foi observada redução da severidade da doença (Figuras 10 e 11) com a aplicação da mistura ou separadamente de *B. subtilis* e de *B. licheniformis* na concentração de 1×10^8 UFC mL⁻¹. Por outro lado, nos ensaios onde foram estudadas as formas e momentos de aplicação da mistura, na concentração de 1×10^{10} UFC mL⁻¹, não foi observada redução da severidade (Tabela 5). Ao contrário, foi observado aumento da severidade da doença. Este estudo, desenvolvido em ambiente controlado, parece ser o primeiro relato do aumento da severidade da murcha de Fusarium com a aplicação da mistura desses microrganismos na cultura do tomate. Por outro lado, os efeitos benéficos da mistura dos isolados de *Bacillus* foram demonstrados em relação à promoção de crescimento em plantas desenvolvidas em substratos não infestados com o patógeno (Figuras 1, 2, 6 e 7, Tabela 4). O entendimento dos resultados se torna mais difícil quando são observados os efeitos dos isolados aplicados separadamente e em diferentes formas e momentos (Tabelas 7). Os dois isolados promoveram o crescimento das plantas em praticamente todos os tratamentos (Tabela 9). Entretanto, apenas o isolado *B. licheniformis* reduziu a área abaixo da curva do progresso da doença (Tabela 7).

Diante desses resultados, poderia supor que a aplicação de altas concentrações da mistura de *B. subtilis* e *B. licheniformis* aumentou a severidade da doença devido à superativação das plantas para responder aos estresses bióticos e abióticos tornando-as mais sensíveis ao patógeno. A possibilidade dos isolados de *Bacillus* não colonizarem as raízes foi descartada, pois foi verificado que as cepas possuem uma boa colonização radicular (Tabela 3), dados corroborados por Ongena et al. (2008) e Gao et al. (2013), os quais verificaram que *Bacillus* spp. são bons colonizadores do sistema radicular. Uma outra possibilidade do aumento na severidade da murcha de Fusarium é a alteração nos mecanismos de defesa do hospedeiro, mediada pelo *Bacillus* no momento em que as células entram em contato e ou penetram nos tecidos da planta, facilitando a infecção pelo patógeno, ou seja, havendo redução momentânea das defesas da planta. Esse fato foi demonstrado por Houterman et al.

(2008), Bonello et al. (2008) e Busby et al. (2013) na qual fungos endofíticos podem suprimir as defesas do hospedeiro e facilitar a infecção por agentes patogênicos.

É importante ressaltar que as cepas de *Bacillus* estudadas não foram efetivas para o controle da murcha do tomateiro em ambiente controlado, onde o potencial de inóculo de FOL utilizado foi alto (2×10^5 de clamidósporos g^{-1} de substrato), bem como em adequadas condições para o desenvolvimento do patógeno. Em condições com menor densidade de inoculo do patógeno, as respostas de interação podem ser diferentes da apresentada neste estudo. Stewart et al. (2001) demonstraram que nem sempre existe uma correlação entre os ensaios em vasos com os ensaios de campo. Outro fato importante é que o produto contendo a mistura de *B. subtilis* e *B. licheniformis* não é recomendado para o controle da murcha de Fusarium do tomateiro, sendo registrada como nematicida microbiológico (AGROFIT, 2019). Também no mercado brasileiro é registrada uma mistura desses isolados (NEMIX) como promotor de crescimento e este efeito foi comprovado por Santos e Rigibelo (2016), bem como no presente estudo.

Assim, os resultados obtidos no presente estudo indicam que os isolados de *B. subtilis* e *B. licheniformis* promovem o crescimento das plantas de tomate na ausência de FOL, podendo ser recomendado para esta finalidade. Em relação ao controle da murcha de Fusarium, novos estudos devem ser conduzidos, sob condições de diferentes concentrações de inóculo do patógeno, bem como diferentes concentrações da mistura de *B. subtilis* e *B. licheniformis*. Associado a isso há necessidade de ser estudar as melhores formas e momentos de desenvolvimento da planta para realizar as aplicações dos organismos.

6. CONCLUSÃO

Bacillus subtilis e *B. licheniformis* promoveu o crescimento de tomateiro tanto quando aplicados em mistura quanto separadamente na ausência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3.

A mistura dos isolados de *B. subtilis* e *B. licheniformis* não controlou a murcha de *Fusarium* em tomateiro quando aplicada na concentração de 1×10^{10} UFC mL^{-1} . Por outro lado, a aplicação de células de *B. licheniformis* separadamente reduziu a severidade da murcha causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3 em tomateiro cultivado em ambiente protegido.

REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, R. A. B.; JABNOUN-KHIAREDDINE, H.; NEFZI, A., AYED, F.; DAAMI-REMADI, M. Field suppression of *Fusarium* wilt and microbial population Shifts in tomato rhizosphere following soil treatment with two selected endophytic bacteria. **Eurasian Journal of Soil Science**, v. 8, p. 208-220, 2019.
- ADREES, H.; HAIDER, M. S.; ANJUM, T.; AKRAM, W. Inducing systemic resistance in cotton plants against charcoal root rot pathogen using indigenous rhizospheric bacterial strains and chemical elicitors. **Crop Protection**, v. 115, p. 75-83, 2019.
- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5. ed. San Diego: Academic Press, 952 p., 2004.
- AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 31 de dezembro de 2019.
- AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia**. 5. ed. Ouro Fino, Agronômica Ceres, v. 1, 907 p., 2016.
- ANIMASHAUN, B. O.; POPOOLA, A. R.; ENIKUOMEHIN, O. A.; AIYELAAGBE, I. O. O.; IMONMION, J. E. Induced resistance to *Fusarium* wilt (*Fusarium oxysporum*) in tomato using plant growth activator, acibenzolar-S-methyl. **Nigerian Journal of Biotechnology**, v. 32, p. 83–90, 2017.
- AZIZOGLU, UGUR. *Bacillus thuringiensis* as a biofertilizer and biostimulator: a mini-review of the little-known plant growth-promoting properties of Bt. **Current Microbiology**, v. 1, p. 1-7, 2019.
- 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, p. 422-422, 2013.
- BHATTACHARYA, A.; GIRI, V. P.; SINGH, S. P.; PANDEY, S.; CHAUHAN, P.; SONI, S. K. Intervention of bio-protective endophyte *Bacillus tequilensis* enhance physiological strength of tomato during *Fusarium* wilt infection. **Biological Control**, v. 139, p. 104074, 2019.
- BIJU, V. C.; FOKKENS, L.; HOUTERMAN, P. M.; REP, M.; CORNELISSEN, B. J. Multiple evolutionary trajectories have led to the emergence of races in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Applied and Environmental Microbiol.** v. 83, p. e02548-16, 2017.
- BLOK, W. J. **Control of soilborne pathogens by inducing fermentative soil conditions. Early decline of asparagus in the Netherlands: etiology, epidemiology and management.** PhD Thesis Wageningen Agricultural University, Wageningen, the Netherlands, 1997.
- BONELLO, P.; CAPRETTI, P.; LUCHI, N.; MARTINI, V.; MICHELOZZI, M. Systemic effects of *Heterobasidion annosum* infection on severity of *Diplodia pinea* tip blight and terpenoid metabolism in Italian stone pine (*Pinus pinea*). **Tree Physiology**, v. 28, p. 1653-1660, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. p. 339, 2009.

BUSBY, P. E.; RIDOUT, M.; NEWCOMBE, G. Fungal endophytes: modifiers of plant disease. **Plant Molecular Biology**, v. 90, p. 645-655, 2016.

CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. John Wiley & Sons, 532 p., 1990.

CANIATO, M. M. **Promoção de crescimento e potencial de indução de resistência em tomateiro à mancha-alvo mediadas por rizobactérias**. Dissertação de mestrado em Agricultura no Trópico Úmido) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA. Manaus, 2018

CARVALHO, C. R. F.; PONCIANO, N. J.; SOUZA, P. M.; SOUZA, C. L. M.; SOUSA, E. F. Viabilidade econômica e de risco da produção de tomate no município de Cambuci, Brasil. **Ciência Rural**, v. 44, p. 2293-2299, 2014.

CAWOY, H.; BETTIOL, W.; FICKERS, P.; ONGENA, M. **Bacillus-based biological control of plant diseases**. In: STOYTICHEVA, M (Ed.). Pesticides in the modern world: pesticides use and management. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP, p. 273-302, 2011.

CLARK, F. E. **Agar-plate method for total microbial count**¹. In: CLARK, F. E. Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties. Monografia em agronomia – Agricultural Research Service, USDA, Fort Collins, Colorado, 1965.

COHN, F. E. Studies on bacteria. **Beiträge Zur Biologie der Pflanzen**. v. 1, p. 124-224, 1872.

CUCU, M. A.; GILARDI, G.; PUGLIESE, M.; GULLINO, M. L.; GARIBALDI, A. An assessment of the modulation of the population dynamics of pathogenic *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in the tomato rhizosphere by means of the application of *Bacillus subtilis* QST 713, *Trichoderma* sp. TW2 and two composts. **Biological Control**, v. 142, p. 104158, 2020.

CUI, W.; HE, P.; MUNIR, S.; HE, P.; LI, X., LI, Y.; HE, Y. Efficacy of plant growth promoting bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* B9601-Y2 for biocontrol of southern corn leaf blight. **Biological Control**, v. 139, p. 104080, 2019.

DE CAL, A.; PASCUAL, S.; LARENA, I.; MELGAREJO, P. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Plant Pathology**, v. 44, p. 909-917, 1995.

DORDEVIC, M.; VATCHEV, T.; GIREK, Z.; SEVIC, M.; ZECEVIC, B.; ZDRAVKOVIC, J.; IVANOVIC, M. Reaction of different tomato cultivars toward race 1 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Genetika**, v. 44, p. 109-118, 2012.

DOS SANTOS JÚNIOR, W. N.; CARVALHO, M. R. M.; CABRAL, C. S. Seleção de híbridos e acessos de tomate para resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3. Embrapa Hortaliças. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, v. 62, p. 5-16, 2009.

EUZÉBY, J. P. List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 47, p. 590-592, 2017.

FALARDEAU, J.; WISE, C.; NOVITSKY, L.; AVIS, T. J. Ecological and mechanistic insights into the direct and indirect antimicrobial properties of *Bacillus subtilis* lipopeptides on plant pathogens. **Journal of Chemical Ecology**, v. 39, p. 869-878, 2013.

FAOSTAT. Value of agricultural production. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QV>> Acessos em: 21 de janeiro de 2020.

FIRA, D.; DIMKIĆ, I.; BERIĆ, T.; LOZO, J.; STANKOVIĆ, S. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. **Journal of Biotechnology**, v. 285, p. 44-55, 2018.

GAO, S.; WU, H.; WANG, W.; YANG, Y.; XIE, S.; XIE, Y.; GAO, X. Efficient colonization and harpins mediated enhancement in growth and biocontrol of wilt disease in tomato by *Bacillus subtilis*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 57, p. 526-533, 2013.

GONÇALVES, A.; AGUIAR, F.; LOPES, C.; FONSECA, M. D. N.; COSTA, H.; REIS, A. Primeiro registro de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3 no Estado de Minas Gerais. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, **46 Reunião Brasileira de Controle Biológico**, v. 11, p. 757, 2013.

HOUTERMAN, P. M.; CORNELISSEN, B. J. C.; REP M. Suppression of plant resistance gene-based immunity by a fungal effector. **Plos Pathogens**, v. 4, n. 5, 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Levantamento sistemático da produção Agrícola, 2019. Disponível em: <[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistemtico_da_Producao_Agricola_\[mensal\]/Tabelas_xls/2019/lspa_201903_01.xls](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistemtico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Tabelas_xls/2019/lspa_201903_01.xls)>. Acesso em: 20 dezembro de 2019.

JANGIR, M.; PATHAK, R.; SHARMA, S.; 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.

JOSHI, R. A review of *Fusarium oxysporum* on its plant interaction and industrial use. **Journal of Medicinal Plants**, v. 6, p. 112-115, 2018.

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

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

LOOS, R. A.; SILVA, D. D.; FONTES, P. C. R.; PICANÇO, M. C. Identificação e quantificação dos componentes de perdas de produção do tomateiro em ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**, v. 26, p. 281-286, 2008.

- LOPES, C. A.; REIS, A.; ÁVILA, C. Principais doenças do tomate para mesa causadas por fungos, bactérias e vírus. **Informe Agropecuário**, v. 24, p. 66-78, 2003.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. Brock biology of microorganisms. **Pearson Education**, 1155 p., 2015.
- MARTINS, M. K. **Variabilidade genética de isolados de *Fusarium* spp. e estudo da interação com a planta hospedeira**. Tese de doutorado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo USP, 2005.
- MATES, A.; HALFELD-VIEIRA, B. D. A.; PONTES, N. D. C.; CARDOSO, C. Avaliação da capacidade de indução de resistência por *Bacillus methlotrophicus* visando o controle da mancha-bacteriana do tomateiro. **Summa Phytopathologica**, v. 43, p. 40, 2017.
- MCGOVERN R. J. Management of tomato diseases caused by *Fusarium oxysporum*. **Crop Protection**, v. 73, p. 78-92, 2015.
- MORAIS, T. B.; SWAROWSKY, A. Eficiência de doses de nitrogênio e sombreamento na cultura do tomate. **Novas Edições Acadêmicas**, v. 1, p. 1-100, 2018.
- MORRIS, W. L.; TAYLOR, M. A. The solanaceous vegetable crops: potato, tomato, pepper, and eggplant. **Encyclopedia of Applied Plant Sciences**, v. 3, p. 55-58, 2017.
- ONGENA, M.; JACQUES, P. *Bacillus lipopeptides*: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in Microbiology**, v. 16, p. 115-125, 2008.
- PATEL, S.; SARAF, M. Interaction of root colonizing biocontrol agents demonstrates the antagonistic effect against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* on tomato. **European Journal of Plant Pathology**, v. 149, p. 425-433, 2017.
- PEREIRA, R. B.; PINHEIRO, J. B.; DE CARVALHO, A. D. F. **Diagnose e controle alternativo de doenças em tomate, pimentão, curcubitáceas e cenoura**. Embrapa Hortaliças, circular técnica 121, p. 1-16, 2013.
- PII, Y.; MIMMO, T.; TOMASI, N.; TERZANO, R.; CESCO; S. CRECCHIO, C. Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process. A review. **Biology and Fertility of Soils**, v. 51, p. 403-415, 2015.
- PRIHATNA, CAHYA; BARBETTI, MARTIN J.; BARKER, SUSAN J. A novel tomato *Fusarium* wilt tolerance gene. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1226, 2018.
- RAMAVATH, K.; HAMEEDA, B.; REDDY, G. Enhancement of plant growth in tomato by inoculation with plant growth promoting *Bacillus* spp. **World Journal of Agricultural Research**, v. 7, p. 69-75, 2019.
- 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.; COSTA, H.; BOITEUX, L. S.; LOPES, C. A. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 on tomato in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 426-428, 2005.
- REIS, A.; LOPES, C. A. **Doenças causadas por fungos e distúrbios fisiológicos**. In: CLEMENTE, F. M. V. T.; BOITEUX, L. S. (Ed.). Produção de tomate para processamento industrial. Brasília, DF. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, p. 179-202, 2012.
- RYU, C. M.; FARAG, M. A.; HU, C. H.; REDDY, M. S.; KLOEPPER, J. W.; PARÉ, P.W. Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**. v. 134, p. 1017–1026, 2004.
- SAHU, P. K.; SINGH, S.; GUPTA, A., SINGH; U. B., BRAHMAPRAKASH; G. P.; SAXENA, A. K. Antagonistic potential of bacterial endophytes and induction of systemic resistance against collar rot pathogen *Sclerotium rolfsii* in tomato. **Biological Control**, v. 179 p. 104014, 2019.
- SALLAM, N. M.; ERAKY, A. M.; SALLAM, A. Effect of *Trichoderma* spp. on *Fusarium* wilt disease of tomato. **Molecular Biology Reports**, v. 46, p. 4463-4470, 2019.
- SANTOS, R. M.; RIGOBELLO, E. C. Uso de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* na promoção de crescimento de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar. **Ciência e Tecnologia: Fatec-JB**, v. 8, p. 1-5, 2016.
- SCHORTEMAYER, M.; HARTWIG, U. A.; HENDREY, G. R.; SADOWSKY, M. J. Microbial community changes in the rhizospheres of white clover and perennial ryegrass exposed to free air carbon dioxide enrichment (FACE). **Soil Biology and Biochemistry**, v. 28, p. 1717-1724, 1996.
- SINGH, S. B.; GOWTHAM, H. G.; MURALI, M., HARIPRASAD, P.; LAKSHMEESHA, T. R.; MURTHY, K. N.; NIRANJANA, S. R. Plant growth promoting ability of ACC deaminase producing rhizobacteria native to Sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 18, p. 101089, 2019.
- SNYDER W.C.; HANSEN H.N. Species concept, genetics, and pathogenicity in *Hypomyces solani*. **Phytopathology**. v. 44, p. 338–342, 1953.
- SRINIVAS, C., DEVI; D. N.; MURTHY, K. N.; MOHAN, C. D.; LAKSHMEESHA, T. R., SINGH, B.; TABASSUM, B. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* causal agent of vascular wilt disease of tomato: Biology to diversity—A review. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 7, p. 1315-1324, 2019.
- STEWART, A. Commercial biocontrol-reality or fantasy? **Australasian Plant Pathology**, v. 30, p. 127-131, 2001.
- SUKKASEM, P.; KURNIAWAN, A.; KAO, T. C.; CHUANG, H. W. A multifaceted rhizobacterium *Bacillus licheniformis* functions as a fungal antagonist and a promoter of plant growth and abiotic stress tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 155, p. 541-551, 2018.

TAHIR, H. A. S.; WU, H.; RAZA, W.; HANIF, A.; WU, L. COLMAN, M. V.; GAO, X. Plant growth promotion by volatile organic compounds produced *Bacillus subtilis* SYST2. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 171. 2017.

TOKESHI, H.; GALLI, F. **Variabilidade de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Sny & Hans em São Paulo**. Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, v. 23, p. 217-227, 1966.

WU, L.; WU, H. J.; QIAO, J.; GAO, X.; BORRISS, R. Novel routes for improving biocontrol activity of *Bacillus* based bioinoculants. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1395, 2015.

XU, S. J.; PARK, D. H.; KIM, J. Y.; KIM, B. S. Biological control of gray mold and growth promotion of tomato using *Bacillus* spp. isolated from soil. **Tropical Plant Pathology**, v. 41, p. 169-176, 2016.

YASMIN, S.; ZAKA, A.; IMRAN, A.; ZAHID, M. A.; YOUSAF, S.; RASUL, G.; ARIF, M.; MIRZA, M. S. Plant growth promotion and suppression of bacterial leaf blight in rice by inoculated bacteria. **Plos One**. v. 11, p.7. 2016.