



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

PAULA PINHEIRO SANCHES

**CONTROLE IN VITRO DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS E
DE TOMBAMENTO DE MUDAS DE TOMATEIRO POR
Bacillus velezensis LABIM40**

Londrina
2019

PAULA PINHEIRO SANCHES

**CONTROLE IN VITRO DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS E
DE TOMBAMENTO DE MUDAS DE TOMATEIRO POR
Bacillus velezensis LABIM40**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de mestre em Agronomia (Fitossanidade/Fitopatologia).

Orientadora: Profa. Dra. Maria Isabel Balbi-Peña

Coorientador: Prof. Dr. Admílton Gonçalves de Oliveira Júnior

Londrina
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Sanches, Paula Pinheiro.

Controle in vitro de fungos fitopatogênicos e de tombamento de mudas de tomateiro por *Bacillus velezensis* labim40 / Paula Pinheiro Sanches. - Londrina, 2019.
72 f. : il.

Orientador: Maria Isabel Balbi-Peña.

Coorientador: Admilton Gonçalves de Oliveira Júnior.
(dissertação) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2019.
Inclui bibliografia.

1. Fitopatologia - . 2. Pragas - Controle biológico - . 3. Plantas - Fungos - . I. Balbi-Peña, Maria Isabel. II. Oliveira Júnior, Admilton Gonçalves de. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

PAULA PINHEIRO SANCHES

**CONTROLE IN VITRO DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS E DE
TOMBAMENTO DE MUDAS DE TOMATEIRO POR
Bacillus velezensis LABIM40**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de mestre em Agronomia (Fitossanidade/Fitopatologia).

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Maria Isabel Balbi-
Peña
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Hiroshi Sumida
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Kátia Regina F. Schwan-Estrada
Universidade Estadual de Maringá – UEM

Londrina, 21 de fevereiro de 2019.

Dedico este trabalho a minha família, que mesmo quando longe sempre esteve perto.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, João Francisco e Marília, por todo o amor, educação e incentivo que sempre me deram, além do privilégio da convivência diária na jornada deste mestrado;

Ao meu namorado, Luiz Henrique, pela ajuda constante desde a execução de experimentos até à elaboração desta dissertação e, principalmente, por ter entrado na minha vida e sido minha alegria diária no último ano;

As minhas irmãs, Claudia e Isabela, por tornarem essa caminhada tão mais leve e feliz; e aos meus cunhados, Lucas e Tiago, meus irmãos do coração;

Ao meu querido professor Gabardo, que mais do que ensinar conceitos de genética e estatística, sempre me mostrou o valor do caráter e da ética profissional no meio acadêmico;

A minha psicóloga Renata, que me auxiliou a manter minha saúde mental em dia (risos); e ao casal Ana Célia e Renan - e ao pequeno Vicente, por tornarem meus dias mais saudáveis e alegres;

A minha orientadora Maria Isabel, pela orientação, ensinamentos e apoio; e ao meu coorientador Júnior, pela inspiração, ensinamentos e por acreditar no meu potencial;

Aos meus companheiros do Laboratório de Biotecnologia Microbiana, o LaBiM: Júlia, que tanto me instruiu e ajudou, Larissa, Mirela, Boi, Allan, Giovana, Gleice, Rose e Malu;

Aos amigos de mestrado Vinádio, Renato e Gustavo, sempre presentes e dispostos a ajudar;

A minha amiga/irmã Dagna, meu parceiro João e às agrobests curitibanas do meu coração, Mahara e Natacha, pela eterna amizade;

Ao professor Ciro, ao servidor técnico José e ao estagiário Luís Bocalete, do laboratório de Fitopatologia, pelo auxílio na condução dos experimentos;

Aos professores da Pós-Graduação em Agronomia, técnicos e servidores da UEL;

À CAPES, pela concessão da bolsa durante o segundo ano de mestrado;

À Londrina, cidade de onde não quero mais ir embora.

“Quem vence sem riscos, triunfa sem dignidade”

Augusto Cury

SANCHES, Paula Pinheiro. **Controle *in vitro* de fungos fitopatogênicos e de tombamento de mudas de tomateiro por *Bacillus velezensis* LABIM40**. 2019. 72 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar o antagonismo exercido pela bactéria *Bacillus velezensis* LABIM40 contra os fungos *Alternaria linariae* (AL), *Botryotinia squamosa* (BS), *Colletotrichum lindemuthianum* (CL), *Gibberella zeae* (GZ) e *Rhizoctonia solani* (RS) em condições *in vitro*, o efeito de promoção de crescimento de plantas de tomateiro e o controle do tombamento causado por *R. solani* em câmara de crescimento de plantas, através de tratamento de sementes à base de suspensão de células da LABIM40, sobrenadante de cultivo livre de células (SLC), SLC de LABIM40 concentrado dez vezes (SLCx10), produto comercial à base de *Bacillus amyloliquefaciens* (PC_1), produto comercial à base de *Bacillus subtilis* (PC_2) e controle (água deionizada estéril), aos 21 dias após a semeadura (DAS). Os ensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial. Em teste de cultura dupla constatou-se antibiose da bactéria sobre todos os fungos. Quando confrontados com o SLC da cepa LABIM40 em teste de difusão em poço em meio solidificado, verificou-se inibição de 46,6, 67,4, 64,7 49,0 e 54,4% no crescimento micelial de AL, BS, CL, GZ e RS, respectivamente. A concentração inibitória mínima (CIM) para cada fungo foi determinada através do emprego de diferentes concentrações de SLC incorporado ao meio BDA, seguido de análise de regressão das respostas de inibição de crescimento micelial. Com exceção de *A. linariae*, todos os fungos obtiveram resultados ajustados a modelos logarítmicos. Em teste de germinação de sementes *in vitro* apenas o tratamento à base de SLCx10 apresentou resultado estatisticamente inferior ao controle, sugerindo um efeito fitotóxico deste tratamento aplicado na semente. Em ensaio em câmara de crescimento de plantas, os produtos foram avaliados sobre o controle do tombamento em plântulas semeadas em substrato estéril e inoculado com *R. solani* e sobre a promoção de crescimento de plântulas aos 21 DAS. As sementes apresentaram 80% de germinação em substrato estéril e 38% quando inoculado com *R. solani*, não diferindo estatisticamente entre tratamentos. Na presença do fungo no substrato, SLCx10 teve sobrevivência de plântulas 36% superior ao tratamento controle, sendo estatisticamente superior aos demais produtos testados. Não foi verificado efeito de promoção de crescimento em plantas através do comprimento de caule e raiz e massa de plantas, que foram em média 34,05, 17,08 e 31,2% menores quando o cultivo foi realizado na presença do fungo. Concluiu-se que a cepa LABIM40 apresenta capacidade de inibir *in vitro* o crescimento micelial das cinco espécies de fungos fitopatogênicos e determinou uma sobrevivência de plântulas aos 21 DAS 36% superior ao controle em ensaio inoculado com *R. solani* e conduzido em câmara de crescimento. A bactéria e seu SLC não promoveram crescimento de plantas através do tratamento de sementes de tomateiro.

Palavras-chave: Controle biológico. *Rizobactérias* promotoras do crescimento de plantas. *Rhizoctonia solani*. *Solanum lycopersicum*.

SANCHES, Paula Pinheiro. **In vitro control of phytopathogenic fungi and damping-off of tomato by *Bacillus velezensis* LABIM40**. 2019. 83 p. Dissertation (Master's degree in Agronomy) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the antagonism of *Bacillus velezensis* LABIM40 against *Alternaria linariae*, *Botryotinia squamosa*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Gibberella zeae* and *Rhizoctonia solani* fungi under in vitro conditions and the effect of plant growth-promoting in tomato and control of damping-off caused by *R. solani* in a plant growth chamber, by seed treatment with LABIM40 cell suspension, cell-free culture supernatant (SLC), LABIM40 10 times concentrated SLC (SLCx10), two commercial products based on *Bacillus amyloliquefaciens* (PC_1) and *Bacillus subtilis* (PC_2) and control (sterile deionized water) at 21 days after sowing (DAS). The trials were conducted in a completely randomized design and were evaluated in a factorial scheme. In a dual culture test, bacterial antibiosis was observed over the fungi, then comparing with the agar well diffusion test with LABIM40' SLC, which inhibited in 46,6, 67,4, 64,7, 49,0 and 54,4% the mycelial growth of the mentioned species, respectively. The minimum inhibitory concentration (MIC) for each fungus was determined by employing different concentrations of SLC incorporated in BDA media, followed by regression analysis of mycelial growth inhibition responses. In exception of *A. linariae*, all fungi obtained results adjusted to logarithmic models. In seeds germination test only the treatment based on SLCx10 presented a statistically lower result than the control, suggesting a phytotoxic effect of the concentrated SLC applied to the seed. In plant growth chamber tests, treatments were evaluated on the control of damping-off in seedlings cultivated on sterile substrate and inoculated with *R. solani* and on the promotion of plant growth at 21 DAS. The treatments presented 80% of germination in sterile substrate and 38% when inoculated with *R. solani*, not statistically different from each other. In the presence of the fungus in the substrate, SLCx10 had survival 36% higher than the control treatment, being statistically superior to the other products tested. No effect of plant-growth promotion was verified by measuring stem length and roots and plant mass, which were on average 34.05, 17.08 and 31.2% lower when the cultivation was carried out in the presence of fungus. It was concluded that the LABIM40 strain has the capacity to inhibit the mycelial growth of the five phytopathogenic fungi tested in in vitro culture and showed a biocontrol of the fungus *R. solani* only in the survival question. The bacteria and its products did not promote plant-growth through the treatment of tomato seeds.

Key-words: Biological control. Plant-growth promoting rhizobacteria. *Rhizoctonia solani*. *Solanum lycopersicum*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 –** Teste de cultura dupla entre *Bacillus velezensis* LABIM40 e os fungos *Alternaria linariae* (AL), *Botryotinia squamosa* (BS), *Colletotrichum lindemuthianum* (CL), *Gibberella zeae* (GZ) e *Rhizoctonia solani* (RS).....40
- Figura 2 –** Porcentagem de inibição de crescimento micelial de colônias dos fungos *Alternaria linariae*, *Botryotinia squamosa*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Gibberella zeae* e *Rhizoctonia solani* confrontadas com a bactéria *Bacillus velezensis* LABIM40 em teste de cultura dupla41
- Figura 3 –** Curva de crescimento microbiano da cepa *Bacillus velezensis* LABIM40 durante 72 horas de cultivo43
- Figura 4 –** Teste de difusão em poço entre o sobrenadante livre de células (SLC) da cepa LABIM40 e os fungos *Alternaria linariae*, *Botryotinia squamosa*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Gibberella zeae* e *Rhizoctonia solani* (A) e crescimento micelial de *G. zeae*, *R. solani*, *B. squamosa*, *A. linariae* e *C. lindemuthianum* em cultura pura e confrontados com o sobrenadante livre de células da cepa LABIM40 de *Bacillus velezensis* em teste de difusão em poço (B)46
- Figura 5 –** Porcentagem de inibição de crescimento micelial (ICM %) de colônias dos fungos *Alternaria linariae* (AL), *Botryotinia squamosa* (BS), *Colletotrichum lindemuthianum* (CL), *Gibberella zeae* (GZ) e *Rhizoctonia solani* (RS) confrontadas com o sobrenadante livre de células (SLC) de *Bacillus velezensis* LABIM40 em teste de difusão em poço.....47
- Figura 6 –** Concentração inibitória mínima, em µg mL⁻¹, de sobrenadante livre de células de *Bacillus velezensis* LABIM40 para o crescimento dos fungos *Botryotinia squamosa* (A), *Colletotrichum lindemuthianum* (B), *Gibberella zeae* (C) e *Rhizoctonia solani* (D).....50
- Figura 7 –** Comprimento de plântulas oriundas de sementes tratadas cultivadas em substrato de papel estéril em placas de Petri.....52

Figura 8 –	Porcentagem de germinação de sementes tratadas de tomate em substrato estéril e inoculado com <i>Rhizoctonia solani</i>	53
Figura 9 –	Massa, em gramas, de plântulas oriundas de sementes de tomate tratadas com sobrenadante livre de células (SLC) bruto da cepa LABIM40, SLC dez vezes concentrado, suspensão de células de <i>B. velezensis</i> LABIM40, água deionizada estéril (testemunha), PC_1 e de sementes cultivadas em células com aplicação de PC_2 em cultivo em substrato sem e com <i>Rhizoctonia solani</i>	56

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	Fungicidas microbiológicos liberados para controle de <i>Rhizoctonia solani</i> para o estado do Paraná	27
TABELA 2 –	Diâmetro micelial de colônias puras de <i>Alternaria linariae</i> , <i>Botryotinia squamosa</i> , <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> , <i>Gibberella zeae</i> e <i>Rhizoctonia solani</i> e de colônias confrontadas com a bactéria <i>Bacillus velezensis</i> LABIM40	40
TABELA 3 –	Crescimento microbiano de <i>Bacillus velezensis</i> LABIM40 ao longo do tempo	44
TABELA 4 –	Porcentagem de inibição de crescimento micelial (ICM %) em placas com concentrações crescentes de sobrenadante livre de células (SCL) de <i>Bacillus velezensis</i> LABIM40 incorporadas no meio de cultura batata-dextrose-ágar.....	49
TABELA 5 –	Comprimento de radícula e hipocótilo de plântulas oriundas de sementes tratadas com água deionizada estéril (controle), suspensão de células da LABIM40, SLC, SLCx10 e PC_1 aos 7 dias após a semeadura em papel filtro estéril umedecido em placas de Petr	i52
TABELA 6 –	Porcentagem de sobrevivência de plântulas aos 21 DAS oriundas de semente tratada com diferentes produtos em substrato inoculado e sem inocular com <i>Rhizoctonia solani</i>	54
TABELA 7 –	Comprimento, em centímetros, do caule de plântulas aos 21 DAS oriundas de semente tratadas com diferentes produtos em substrato inoculado e sem inocular com <i>Rhizoctonia solani</i>	57
TABELA 8 -	Comprimento, em centímetros, da raiz de plântulas aos 21 DAS oriundas de semente tratadas com diferentes produtos em substrato inoculado e sem inocular com <i>Rhizoctonia solani</i>	57

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1	CONTROLE BIOLÓGICO DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS.....	3
2.2	O GÊNERO <i>BACILLUS</i>	5
2.3	<i>BACILLUS</i> COMO AGENTE DE CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS E PROMOTOR DE CRESCIMENTO DE PLANTAS	6
2.4	FUNGOS FITOPATOGÊNICOS.....	12
2.4.1	<i>Alternaria linariae</i>	12
2.4.1.1	<i>Pinta preta do tomateiro</i>	12
2.4.2	<i>Botryotinia squamosa</i>	16
2.4.2.1	<i>Queima-das-pontas da cebola</i>	16
2.4.3	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	18
2.4.3.1	<i>Antracnose do feijoeiro</i>	19
2.4.4	<i>Gibberella zeae</i>	21
2.4.4.1	<i>Podridão rosada da espiga do milho</i>	22
2.4.5	<i>Rhizoctonia solani</i>	24
2.4.5.1	<i>Tombamento de mudas</i>	24
2.5	A CULTURA DO TOMATEIRO	27
3	ARTIGO A.....	30
3.1	RESUMO	30
3.2	ABSTRACT.....	31
3.3	INTRODUÇÃO.....	32
3.4	MATERIAL E MÉTODOS	33
3.4.1	<i>Identificação e origem da bactéria</i>	33
3.4.2	<i>Origem dos isolados fúngicos e condições de crescimento</i>	33
3.4.3	<i>Testes in vitro</i>	34
3.4.4	<i>Testes in vivo</i>	37
3.4.5	<i>Efeito dos tratamentos sobre o desenvolvimento vegetativo de plantas de tomateiro</i>	40
3.4.6	<i>Análise estatística</i>	40
3.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
3.6	CONCLUSÃO.....	59
3.7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	60
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

1 INTRODUÇÃO

As doenças de plantas cultivadas são um grande desafio para a agricultura em todo o mundo. Os sistemas de manejo integrado de doenças (MID) que combinam opções culturais, químicas e biológicas são os mais eficientes e sustentáveis. O controle biológico de doenças, sendo ecologicamente correto, tem se tornado ainda mais desejável com a verificação do desenvolvimento de resistência de patógenos de plantas a fungicidas e pelo custo e tempo demandados para a elaboração de novos agroquímicos.

A cultura do tomateiro é suscetível a mais de 200 doenças, tanto durante o cultivo como em pós-colheita (AGRIOS, 2005). Devido à grande vulnerabilidade da cultura a doenças, as quantidades de agrotóxicos empregados para o seu controle são expressivas (ALVARENGA, 2004). As variedades de tomate mais cultivadas são suscetíveis a doenças de solo, especialmente às doenças causadas por *Rhizoctonia solani* (Kühn). Este patógeno, mais conhecido como agente de damping-off ou tombamento de mudas, também é responsável por causar a podridão do colo e da raiz, levando a perdas significativas no rendimento de diversas culturas agrícolas. O controle eficiente da doença é difícil devido à ampla gama de hospedeiros do fungo, à persistência da suas estruturas de sobrevivência (escleródios) no solo, à ausência de resistência genética e à limitada eficácia dos fungicidas químicos disponíveis (ZACHOW; GROSCHE; BERG, 2011). Além de os agroquímicos representarem um dos principais custos na produção de tomate, os agricultores brasileiros precisam ser sensibilizados sobre o uso de produtos recomendados e apropriados para a cultura, uma vez que o uso de defensivos proibidos na produção de tomate ainda é significativo (ANVISA, 2016; CEPEA, 2018). Tais questões têm focalizado os esforços de pesquisa no desenvolvimento de medidas ambientalmente seguras, duradouras e eficientes, a exemplo do controle biológico.

O desenvolvimento de produtos biológicos comerciais para o controle de patógenos de plantas vem se difundindo ao redor do mundo e atualmente está entre as áreas de maior crescimento no setor agrícola. Os ingredientes ativos desses produtos são microrganismos benéficos naturais ou seus derivados e sua eficácia tem sido demonstrada no manejo de múltiplos patógenos, sem causar danos à planta hospedeira (HUANG et al., 2017; PARIKH; ESKELSON;

ADESEMOYE, 2018). O gênero *Bacillus* detém grande potencial biotecnológico e muitas espécies podem ser utilizadas na produção de antibióticos, enzimas e outros metabólitos de interesse para a indústria farmacêutica, de alimentos e agrícola (ABDELNASSER et al., 2017; AYALA et al., 2017; CHEN et al., 2019; RIBEIRO et al., 2018). As bactérias do gênero *Bacillus* possuem caracteres que propiciam seu uso para o controle biológico de doenças de plantas, como a capacidade de síntese de antibióticos e metabólitos secundários com atividade antagônica contra bactérias e fungos fitopatogênicos (LANNA-FILHO, SOUZA, ALVES, 2017; BAPTISTA et al., 2018; PAZ et al., 2018).

O objetivo geral deste trabalho foi investigar se a cepa *Bacillus velezensis* LABIM40 e seu sobrenadante de cultivo livre de células são capazes de controlar o crescimento de cinco fungos fitopatogênicos em condições *in vitro* e o tombamento do tomateiro causado por *Rhizoctonia solani*, além de avaliar se a LABIM40 ou seus derivados promovem o crescimento de tomateiro. Os objetivos específicos foram: I - Determinar a concentração inibitória mínima do sobrenadante livre de células (SLC) da cepa LABIM40 capaz de inibir o crescimento *in vitro* dos fungos estudados; II – Determinar a incidência do tombamento de mudas de tomateiro previamente tratadas com suspensão de células da LABIM40, SLC bruto, SLC concentrado 10 vezes e com dois produtos comerciais, um à base de *Bacillus amyloliquefaciens* e o outro à base de *Bacillus subtilis* em substrato previamente inoculado com o fungo *R. solani*; III – Investigar se esses tratamentos promovem o crescimento no tomateiro.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CONTROLE BIOLÓGICO DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

O controle biológico de doenças de plantas através de práticas empíricas remonta-se a 5.000 a.C. De acordo com Cook e Baker (1983), nessa época o povo egípcio cultivava cebola sem indícios da doença causado pelo patógeno *Sclerotium cepivorum*. É sabido que as inundações cíclicas do rio Nilo mantinham as margens cultiváveis cobertas com água, favorecendo o predomínio de antagonistas naturais deste patógeno na microbiota do solo. Uma vez alterado o ciclo de inundações pela construção de uma represa na região, o problema apareceu.

Os primeiros trabalhos envolvendo a introdução consciente de antagonistas visando o controle biológico de doenças de plantas foram realizados na primeira metade do século XX. A década de 40 marcou o início de expressivas pesquisas com o uso de fungos e estirpes atenuadas de vírus como agentes de controle biológico. Já na década seguinte iniciaram-se os estudos com procariotos para o biocontrole de enfermidades de plantas, sendo que as pesquisas na área vêm aumentando desde então (COOK; BAKER, 1983).

As medidas de manejo de enfermidades de plantas, quando tomadas isoladamente, não controlam as doenças de forma satisfatória. O manejo deve adotar estratégias que considerem modificações nos fatores patógeno, hospedeiro e ambiente de maneira equilibrada (ZAMBOLIM, 2010). Como consequência, a associação do uso de produtos químicos a métodos alternativos de controle de doenças, a exemplo do controle biológico, otimiza sua eficiência e durabilidade e minimiza os problemas oriundos de seu uso inadequado (MONTEALEGRE et al., 2003; KUMAR et al., 2015; HAMZA, MOHAMED, DERBALAH, 2016; ZOHORA, ANO, RAHMAN, 2016; BARTHOLOMAUS et al., 2017). Desta forma, torna-se possível reduzir a população de patógenos no campo com a adoção de medidas racionais de manejo após o conhecimento detalhado dos aspectos epidemiológicos da doença (ZAMBOLIM, 2010).

O uso de organismos vivos como agentes de biocontrole vem ganhando atenção como um método potencial de controle ambientalmente correto, seguro e eficaz contra fitopatógenos (XIANG; LAWRENCE; DONALD, 2018). A

utilização de diferentes organismos, como bactérias, actinomicetos, leveduras e fungos filamentosos demonstraram substancial progresso no manejo dos fitopatógenos e de suas micotoxinas e evidenciaram o grande leque de utilização de bioprodutos no controle fúngico (PEREIRA et al., 2011; NAYAKA et al., 2009; ETCHEVERRY et al., 2009). Cabe ressaltar que esta metodologia de controle tem potencial de utilização no campo, por meio do tratamento de sementes, grãos, aplicação no sulco de plantio e no armazenamento através da pulverização de bioformulados nos produtos vegetais (LANNA-FILHO, SOUZA, ALVES, 2017). A utilização de bactérias antagonistas destaca-se dos demais microrganismos em função da sua grande capacidade de inibição do crescimento fúngico e de suas toxinas, já havendo diversos bioprodutos comerciais registrados a partir de diferentes espécies bacterianas (ROMEIRO, 2007). Embora a utilização de produtos microbiológicos ainda seja pequena em relação aos produtos químicos registrados, estes bioprodutos representam um mercado em ascensão vertiginosa no Brasil e no mundo (MAPA, 2019).

O antagonismo microbiano pode ocorrer de inúmeras formas, podendo se dar por exclusão de nicho ecológico, competição por nutrientes, produção de toxinas, enzimas líticas e compostos antimicrobianos voláteis, parasitismo e predação, indução de respostas sistêmicas de defesa da planta, interferência com sinais (*quorum sensing*), produção de sideróforos e de ácido cianídrico, detoxificação do meio ou por antibiose direta através da produção de antimicrobianos (ROMEIRO, 2007).

A supressão da doença por agentes de controle biológico também consiste em interações entre a planta, o patógeno, o agente responsável pelo controle, a comunidade microbiana sobre e ao redor da planta e o ambiente físico (BETTIOL, 2003). Dessa forma um bom microrganismo de supressão precisa ter habilidade de competir por recursos limitados em ambientes adversos, expostos a variações climáticas e de disponibilidade de nutrientes (SCHIRAWSKI; PERLIN, 2018).

A busca por antagonistas pode priorizar isolados pertencentes à própria comunidade nativa do ambiente onde é feita a aplicação, como as folhas ou o solo em que se encontra a planta. Segundo Podile e Kishore (2006) as bactérias dos gêneros *Aeromonas*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Arthobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* e *Serratia*

são as mais encontradas associadas a raízes de plantas no solo. A filosfera, incluindo populações endofíticas, é habitada por diferentes microrganismos como leveduras, fungos filamentosos e bactérias, sendo que muitos destes podem ser antagonistas de um ou mais patógenos (GAO et al., 2017; ANSARY et al., 2018).

Apesar de existirem muitos agentes de biocontrole comprovadamente capazes de inibir patógenos em condições *in vitro* e *in vivo*, estes dificilmente fazem parte da primeira escolha para o controle de doenças em lavouras, tendo em vista que nem todos os microrganismos confirmam sua atividade quando utilizados a campo e/ou em larga escala (KAVROULAKIS et al., 2010; MASSAWE et al., 2018). Portanto, devem ser investigados novos locais de prospecção de agentes de controle biológico, novas espécies e novas formulações.

2.2 O GÊNERO *BACILLUS*

As bactérias do gênero *Bacillus* são de grande importância econômica e ambiental, não apenas por seus benefícios aos seres humanos, mas também porque são de fácil manejo. Vários laboratórios ao redor do mundo realizam isolamento, identificação de linhagens e seleção de espécies de *Bacillus* por sua capacidade de produzir endósporos, dado que são muito resistentes e podem sobreviver em condições extremamente hostis (KAHN; MAYMON; HIRSCH, 2017).

O gênero *Bacillus* pertencente ao reino *Bacteria*, filo *Firmicutes*, classe *Bacilli* e ordem *Bacillales* foi originalmente relatado por Cohn (1872), quem nomeou a espécie tipo como *Bacillus subtilis* (CLAUS; BERKELEY, 1986). Encontra-se atualmente dividido em seis distintos subgrupos filogenéticos que abrigam todas as espécies de acordo com o perfil da sequência do gene RNA ribossomal 16S (ou 16S rRNA), sendo eles *B. polymyxa*, *B. subtilis* (inclui *B. brevis*), *B. licheniformis*, *B. cereus* e *B. anthracis* (VERDESOTO, 2018). Segundo dados do banco de informações “List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature” existem atualmente 377 espécies e oito sub-espécies de bactérias do gênero *Bacillus* com descrição válida de acordo com o manual de Bergey’s, que sistematiza a classificação taxonômica de procariotos (EUZÉBY et al., 2018).

Como a origem do nome já assinala, microrganismos deste gênero têm forma de bastão ou bastonete, normalmente arranjados em colônias. São caracterizados como bactérias gram-positivas, aeróbias ou anaeróbias facultativas,

com capacidade de formação de endósporos e síntese da enzima catalase, além de crescerem sobre fontes de carbono variadas (MADIGAN et al., 2016).

Outra característica metabólica associada a *Bacillus* spp. é a aptidão para a síntese de antibióticos como bacitracina, polimixina, tirocidina, gramicidina e circulina, a qual se dá durante e após o processo de esporulação, o que mitiga a difusão do seu uso em diversos setores da indústria (MADIGAN et al., 2016).

Os microrganismos deste gênero encontram-se amplamente distribuídos ao redor do globo, estando presentes em diversos nichos ecológicos. Variadas espécies foram isoladas de diversos habitats terrestres, marinhos e aquáticos (ABDELNASSER et al., 2017; CHEN et al., 2019; RITCHIE et al., 2017; SAGGESE et al., 2018), ambientes de alta e/ou baixa temperatura (YADAV et al., 2016; PERFUMO; BANAT; MARCHANT, 2018), e também no interior de tecidos de diferentes plantas tais como catalpa (*Catalpa ovata*) (GAO et al., 2017); bahera (*Terminalia bohera*), manjeriço (*Ocimum gratissimum* L.), violeta (*Saintpaulia* spp.) e mandioca (*Manihot esculenta*) (ANSARY et al., 2018); trigo (*Triticum aestivum*) (LIU et al., 2009); milho (*Zea mays*) (MASSAWE et al., 2018; RIBEIRO et al., 2018); algodão (*Gossypium hirsutum*) (KÄMPFER et al., 2015); e tomate (LANNA-FILHO, SOUZA, ALVES, 2017).

Desse modo, apesar de algumas espécies de *Bacillus* spp. produzirem toxinas problemáticas para a saúde humana e animal, o gênero detém grande potencial biotecnológico e muitas espécies podem ser utilizadas na produção de antibióticos, enzimas e outros metabólitos de interesse para a indústria farmacêutica, de alimentos e agrícola (ABDELNASSER et al., 2017; AYALA et al., 2017; CHEN et al., 2019; RIBEIRO et al., 2018). Para esta última, espécies de *Bacillus* possuem caracteres que propiciam seu uso para o controle biológico, como a capacidade de síntese de antibióticos e metabólitos secundários com atividade antagônica contra bactérias e fungos fitopatogênicos (LANNA-FILHO, SOUZA, ALVES, 2017; BAPTISTA et al., 2018; PAZ et al., 2018).

2.3 BACILLUS COMO AGENTE DE CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS E PROMOTOR DE CRESCIMENTO DE PLANTAS

Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP) são bactérias de vida livre que colonizam a rizosfera trazendo efeitos benéficos às

plantas, influenciando positivamente em seu crescimento (KHALID; ARSHAD; ZAHIR, 2004; IDRIS et al., 2007; SON et al., 2014), produção (MIA et al., 2010) e extração de nutrientes pela planta (LIU et al., 2017). Algumas espécies igualmente apresentam a capacidade de controle biológico de certas doenças de plantas (SON et al., 2014; CHOWDHURY et al., 2015; PAZ et al., 2018).

As RPCP possuem mecanismos diretos e indiretos que auxiliam na supressão de fitopatógenos (SAYYED; REDDY; AL-TURKI, 2016). Os mecanismos diretos envolvem a produção de antibióticos, sideróforos e enzimas líticas como a glucanase (SON et al., 2014; LANNA-FILHO, SOUZA, ALVES, 2017). Os mecanismos indiretos envolvem a indução de resistência local e sistêmica contra grande diversidade de patógenos (PHI et al., 2010; SON et al., 2012; WANG et al., 2014; NIE et al., 2017).

O efeito das RPCP na produção vegetal varia, ainda, de acordo com as condições de campo, casa de vegetação e laboratório, dada a ampla diversidade de espécies de microrganismos, diferentes características físico-químicas dos solos bem como de variações climáticas do meio ambiente (ZAIDI et al., 2009).

Em um estudo de análise genômica de *Bacillus* spp., Dutta et al. (2018) revelaram que as cepas BTS-3 de *B. subtilis* e BTS-4 e BTLK6A de *Bacillus amyloliquefaciens*, analisadas em seu trabalho, possuem genes responsáveis pela biossíntese de diversos antibióticos e enzimas com funções líticas da parede celular bem como de indução de resistência sistêmica em plantas. As três cepas exibiram biocontrole no patossistema brusone (*Magnaporthe oryzae*) – trigo (*Triticum aestivum* L.), tanto em condições *in vitro* quanto *in vivo*.

Arguelles-Arias et al. (2009) ao estudarem a cepa *B. amyloliquefaciens* GA1 identificaram a capacidade de síntese de antibióticos e outros metabólitos secundários que podem ser aplicados no biocontrole de patógenos de plantas. Em outro estudo, o isolado de *B. megaterium* B 388 foi reconhecido por sua elevada síntese de compostos voláteis e com capacidade de difusão, o qual inibiu o crescimento dos fungos fitopatogênicos *Alternaria alternata* e *Fusarium oxysporum* (TRIVEDI; PANDEY, 2009).

Após o tratamento com a espécie *B. velezensis* BAC03, nove tipos diferentes de plantas – beterraba (*Beta vulgaris* L.), cenoura (*Daucus carota* L.), abóbora (*Cucurbita* spp.), pimenta (*Capsicum frutescens* L.), batata (*Solanum tuberosum* L.), pepino (*Cucumis sativus* L.), rabanete (*Raphanus raphanistrum*

subsp. *sativus*), tomate (*Solanum lycopersicum* L.) e nabo (*Brassica rapa* subsp. *rapa*) - mostraram aumento de crescimento em todas as variáveis avaliadas, sendo estas a altura de planta, o número de flores e a biomassa da parte aérea vegetal. A eficácia para o aumento do crescimento das plantas foi de mais de 200% do controle, dependendo da espécie botânica (MENG; JIANG; HAO, 2016).

Em estudo realizado na Índia, Sunar et al. (2015) isolaram e identificaram a bactéria *Bacillus altitudinis* BRHS/S-73 a partir da rizosfera de chuchu (*Sechium edule* SW), a qual apresentou resultados positivos *in vitro* para solubilização de fosfatos, produção de HCN, sideróforos, ácido indol-3-acético (AIA), quitinase, proteases, bem como inibição de fitopatógenos. Para ensaios em campo, sementes de feijão-da-China (*Vigna radiata*), grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) e soja (*Glycine max* (L.) Merr.) foram microbiolizadas com a bactéria antes da semeadura a campo, obtendo aumento significativo do crescimento das plantas avaliado pelo aumento no comprimento e na biomassa das raízes e da parte aérea em todas as espécies. Também foi constatada a solubilização de fosfato do solo pela bactéria. No mesmo trabalho, além da promoção de crescimento de plantas, *B. altitudinis* BRHS/S-73 reduziu em 74% a podridão da raiz causada por *Thanatephorus cucumeris* (anamorfo: *R. solani*) de feijão-da-China quando *B. altitudinis* foi aplicado à rizosfera antes do desafio do patógeno. A eficácia do controle da bactéria foi de 66,6% mesmo após 30 dias de inoculação do patógeno. As atividades das principais enzimas relacionadas à defesa, como fenilalanina amônia liase, peroxidase, β -1,3-glucanase e quitinase em raízes e folhas de plantas tratadas também foram aumentadas. Os resultados sugerem que *B. altitudinis* BRHS/S-73 é um RPCP que pode ser usado como microrganismo eficiente para o aumento do crescimento de plantas e supressão da podridão de raiz causada por *T. cucumeris*.

Para examinar o efeito de RPCP na emissão de compostos orgânicos voláteis (COVs), produção fenólica total e atividade de fenilalanina amônia-liase (PAL), mudas de hortelã (*Mentha piperita* L.) foram inoculadas ou co-inoculadas com as espécies *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida* SJ04 e *B. subtilis*. As emissões de COVs para os grupos inoculados foram aproximadamente 3 vezes maiores que para os controles. Plantas co-inoculadas obtiveram o maior aumento na emissão de COVs em comparação com plantas apenas inoculadas e de controle. A síntese de compostos fenólicos nas folhas de todas as plantas tratadas foi melhorada significativamente e uma maior atividade da enzima PAL foi observada

em plantas inoculadas. Tendo em vista a importância econômica de COVs e compostos fenólicos para uma extensa lista de aplicações nas indústrias de alimentos e cosméticos, estas cepas têm o potencial de melhorar a produtividade de plantas aromáticas cultivadas (CAPPELLARI et al., 2017).

Wani, Kahn e Zaidi (2010), ao trabalharem com algumas espécies de *Bacillus*, constataram o aumento do crescimento, nodulação, teor de clorofila, produção e teor proteico para a cultura do grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.), além de as bactérias diminuírem a extração radicular de crômio de solo contaminado.

Raasch, Bonaldo e Oliveira (2013) ao trabalharem com a bactéria *B. subtilis* constataram crescimento de 20,3 a 37,2% superior ao controle em mudas de eucalipto (*Eucalyptus* spp.) inoculadas com uma cepa da espécie, as quais exibiram um incremento de biomassa radicular e de parte aérea de 45,9 e 45,1%, respectivamente.

A atividade de biocontrole exercida por RPCP frequentemente é mediada pela ação de metabólitos secundários, a exemplo da fengicina produzida por *B. subtilis* cepa F-20-3 contra o tombamento causado por *Rhizoctonia* sp. (DELEU; PAQUOT; NYLANDER, 2008), e iturina A produzida por *Bacillus amyloliquefaciens* (YU et al., 2002).

A cepa FZB42 de *B. amyloliquefaciens* apresentou controle tanto sobre a bactéria *Xanthomonas oryzae* (WU et al. 2015), como sobre os fungos *Fusarium oxysporum*, *Cladosporium cucumerinum* e *Botrytis cinerea* (CAWOY et al. 2015) e o nematoide *Meloidogyne incognita*, (BURKETT-CADENA et al. 2008; LIU et al., 2013). Além disso, esta cepa produz compostos indólicos (SZILAGYI-ZECCHIN et al., 2016; IDRIS et al., 2007) e sideróforos (SZILAGYI-ZECCHIN et al., 2016; CHEN et al., 2007).

Liu et al. (2017) sugerem que algumas linhagens de RPCP podem sobreviver tanto na rizosfera como no filoplano, dado que certas cepas apresentaram a capacidade de atuar tanto na proteção de doenças foliares quanto radiculares. Em seu trabalho, os autores verificaram que as cepas *B. altitudinis* AP69, *B. velezensis* 197, *B. velezensis* 199, *B. velezensis* 200 e *B. velezensis* 298 mostraram controle do damping-off causado por *Rhizoctonia solani* em pimenta e por *Pythium ultimum* em abóbora através de tratamento de sementes e contra a mancha bacteriana do tomateiro (causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*) e pinta bacteriana do tomateiro (causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) por

meio de aplicações foliares.

As cepas AP305, AP219, AP218, AP213 e AP136 de *B. velezensis* obtiveram controle considerável da doença podridão-negra-das-crucíferas, causada pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, em repolho chinês (*Brassica rapa*), reduzindo em 36% o número de lesões em folhas. Além disso, as cepas induziram a resistência sistêmica na planta e promoveram o aumento do crescimento vegetal tanto em casa de vegetação quanto a campo, obtendo aumento de 25 e 82% no teor de massa fresca de parte aérea e de raízes, respectivamente (LIU et al., 2016).

Lim et al. (2017) detectaram a capacidade de *B. velezensis* G341 secretar bacilomicina L e fengicina A com atividade antifúngica. *B. velezensis* ZJ20 (XU, ZHU, LI, 2016), *B. velezensis* YJ11-1-4 (LEE et al., 2017), *B. velezensis* GQJK49 (MA et al., 2017) e *B. velezensis* 2A-2B (MARTINEZ-RAUDALES et al., 2017) também apresentaram efeitos antifúngicos frente a fungos fitopatogênicos, a exemplo das espécies *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Colletotrichum coccodes*, *Magnaporthe oryzae*, *Alternaria panax* e *Botrytis cinerea*.

Em um trabalho realizado na China com as cepas 5YN8 e DSN012 de *B. velezensis*, Jiang et al. (2018) concluíram que as cepas poderiam atuar como potenciais e eficientes agentes de biocontrole para controlar o mofo-cinzento causado por *Botrytis cinerea* na cultura da pimenta (*Capsicum frutescens*). Tais isolados obtiveram mais de 50% de controle da doença em ensaios *in vivo* e proporcionaram maior crescimento de plantas, dado que plantas tratadas à base das bactérias apresentaram maiores valores de teor de clorofila em seus tecidos, número de folhas e diâmetro de caule. Ainda, os autores sugeriram que a supressão de crescimento e a deformação de esporos de *B. cinerea* observadas poderiam ser uma resposta à ação de alguns metabólitos secundários ou compostos orgânicos voláteis bacterianos, bem como consequência de indução da resistência da planta a este patógeno via sinalização de defesa mediada por salicilato.

Trotel-Aziz et al. (2019), ao estudarem doenças fúngicas do tronco de videira, verificaram aumento de respostas imunes do hospedeiro ao tratarem as plantas com a cepa *Bacillus subtilis* PTA-271, a qual mostrou-se capaz de desintoxicar as fitotoxinas produzidas pela estirpe Np-Bt67 da espécie *Neofusicoccum parvum*.

Em outro trabalho realizado na China, Chen et al. (2019) constataram a habilidade da cepa LDO2 de *B. velezensis* inibir significativamente o crescimento de fitopatógenos de amendoim (*Arachis hypogaea* L.), a exemplo dos fungos *Alternaria tenuissima*, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Fusarium oxysporum*, *F. moniliforme*, *Rhizoctonia solani* e *Rhizopus* sp., que apresentaram redução média do crescimento micelial de 80% e da bactéria *Ralstonia solanacearum*, em condições *in vitro*. Especificamente, a cepa LD02 causou expressiva inibição e deformação do crescimento micelial de *A. flavus*. Neste trabalho, foram identificados clusters de genes responsáveis por metabólitos antifúngicos (fengicina, surfactina, bacilisina) e antibacterianos (butirosina, bacilaína, difficidina, macrolactina, surfactina, bacilisina). A cepa LDO2 também exibiu várias características relacionadas à promoção do crescimento, incluindo solubilização de fosfato, produção de sideróforos e promoção do crescimento da raiz de amendoim.

Abdeljalil et al. (2016), em experimento realizado na Tunísia, testaram 25 isolados de rizobactérias, obtidos a partir da rizosfera de tomateiro (*S. lycopersicum*) sadio coletado de vários locais no país, através de ensaios *in vitro* e *in vivo* contra *R. solani*, agente causal da podridão de raízes. A capacidade supressora de doença e de promoção do crescimento de plantas das rizobactérias associadas ao tomate mostraram redução de 47-100% na severidade da doença e incrementos significativos de 62-76% na altura da planta, 53-86% no peso fresco das raízes e 34-67% no peso fresco da parte aérea, em comparação com plantas inoculadas e com o controle não tratado. Dentre as cepas testadas, *B. thuringiensis* B2 (KU158884), *B. subtilis* B10 (KT921327) e *Enterobacter cloacae* B16 (KT921429) foram os isolados mais eficientes na diminuição do crescimento radial de *R. solani*, suprimindo a severidade da doença e aumentando o crescimento das plantas.

Os isolados QST 713, AP-3 e AP-51 de *B. subtilis* e QST-2808 de *B. pumilus* mostraram-se hábeis para o controle biológico da ferrugem asiática da soja (agente causal *Phakopsora pachyrhizi*), causando redução de 100% na germinação de uredósporos além de diminuir 98,6, 75,3, 61,2, e 97,7% a severidade da doença no teste de folhas destacadas, respectivamente (DORIGHELLO, 2013).

O sobrenadante livre de células da cepa *B. velezensis* LABIM40, bactéria usada neste trabalho, inibe fortemente o crescimento de importantes fungos fitopatógenos como *Sclerotinia sclerotiorum*, *B. cinerea* e *Macrophomina phaseolina*,

mostrando seu alto potencial biotecnológico para o controle biológico de doenças de plantas (BAPTISTA et al., 2018).

2.4 FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

2.4.1 *Alternaria linariae*

Agente causador da pinta-preta do tomateiro, é um fungo de alto potencial destrutivo no cultivo de tomate em campo aberto no Brasil, incidindo sobre folhas, hastes, pecíolos e frutos e capaz de ocasionar elevados prejuízos econômicos (LOURENÇO JR. et al., 2009). Os tecidos maduros normalmente são mais suscetíveis à doença, a qual é mais severa durante a fase de frutificação. As perdas ocasionadas são diretas por meio da infecção de frutos e indiretas vinculadas à redução do vigor da planta, além de danos aos frutos expostos aos raios do sol em decorrência da desfolha (PEREIRA; CARVALHO; PINHEIRO, 2013). A doença é favorecida por temperatura e umidade altas, sendo, portanto, mais severa durante o verão chuvoso.

2.4.1.1 Pinta preta do tomateiro

2.4.1.1.1 Etiologia

No Brasil, o agente causal da pinta-preta nos cultivos de tomate e batata bem como em outras solanáceas foi inicialmente descrito como *Alternaria solani* (RODRIGUES; MIZUBUTI, 2009). Estudos subsequentes identificaram as espécies *A. tomatophila* e *A. grandis* como causadoras da doença nas culturas do tomate e da batata, respectivamente (RODRIGUES et al., 2010).

Em estudo realizado na Holanda, Woudenberg et al. (2014) agruparam as espécies *A. tomatophila*, *A. subcylindrica* e *A. cretica*, agentes causais da pinta-preta em tomateiro, em um mesmo clado sendo sinonimizadas como *A. linariae*. Por sua vez, *A. protenta* foi descrita como agente etiológico da pinta-preta juntamente com *A. solani* e *A. grandis* em batateira.

Alternaria linariae tem micélio septado e ramificado. Os conidióforos são simples, septados, longos, sub-hialinos a escuros com conídios terminais. Estes são multicelulares, com septos transversais e longitudinais, clavados e com uma das extremidades pontiaguda (INOUE-NAGATA et al., 2016).

2.4.1.1.2 Epidemiologia

O fungo se dissemina através de conídios conduzidos pelo vento, chuva ou irrigação, insetos, trabalhadores e implementos agrícolas e pode ser transmitido por sementes. Estas últimas podem disseminar o patógeno a longas distâncias e são fonte de inóculo inicial. Tais esporos sobrevivem em restos culturais infectados e em outras solanáceas, podendo sobreviver ainda em implementos agrícolas e objetos utilizados na armazenagem dos frutos. Caracterizam-se por serem muito resistentes a baixos níveis de umidade, podendo permanecer viáveis por até dois anos nestas condições. Além disso, o fungo também pode sobreviver no solo na forma de micélio até a estação de cultivo seguinte (PEREIRA; CARVALHO; PINHEIRO, 2013; INOUE-NAGATA et al., 2016).

A germinação do patógeno ocorre em ampla faixa de temperatura, variando de 6 a 32 °C, com temperatura ótima na faixa de 28 a 30 °C. A presença de água livre na folha e/ou umidade relativa acima de 90% são essenciais para os processos de germinação e infecção do patógeno. A infecção tem início com a penetração das hifas através dos estômatos ou diretamente por meio da cutícula após a formação de apressórios. No ciclo de *Alternaria* sp. em tomateiro, a colonização ocorre intercelularmente provocando alterações em diversos processos fisiológicos, que se exteriorizam na forma de sintomas. Sob condições de campo os sintomas são visíveis de três a cinco dias após a infecção. As temperaturas ótimas para a colonização situam-se entre 24 a 28 °C. Em condições favoráveis ao progresso da doença, vários ciclos secundários do patógeno podem ocorrer durante o desenvolvimento da cultura, levando a epidemias no campo caracterizadas por intensa redução da área foliar, redução do vigor das plantas, quebra de caules e depreciação de frutos (PEREIRA; CARVALHO; PINHEIRO, 2013; INOUE-NAGATA et al., 2016).

2.4.1.1.3 Sintomas

Sementes infectadas por *Alternaria* spp. podem originar plântulas com sintomas de podridão e anelamento do colo, tombamento em pré e pós-emergência e morte de plantas jovens. Em mudas, o patógeno pode atacar a região do caule próximo ao solo, causando a morte das plantas (PEREIRA; CARVALHO; PINHEIRO, 2013; INOUE-NAGATA et al., 2016).

Nas folhas, por sua vez, são observadas lesões necróticas de coloração marrom escura a preta, com bordos bem definidos, podendo ser mais ou menos circulares, elípticas ou irregulares e apresentar halo amarelado, frequentemente dispostas em forma de anéis concêntricos. Com o progresso da doença, as lesões aumentam rapidamente em tamanho e em número com a destruição total das folhas pelo coalescimento das lesões, que ao atingirem a nervura impedem a circulação de seiva pelos tecidos. A diminuição da área foliar expõe os frutos a queimaduras pelo sol, deixando-os inadequados para a comercialização. No caule e pecíolos de plantas adultas as lesões são escuras, alongadas, circulares e ligeiramente deprimidas. Nestas os anéis concêntricos são bem evidentes, muito similares aos observados nas folhas (PEREIRA; CARVALHO; PINHEIRO, 2013; INOUE-NAGATA et al., 2016).

Finalmente, nos frutos o patógeno causa lesões escuras, deprimidas e com a presença típica de anéis concêntricos, que geralmente se localizam na região peduncular. Frutos acometidos pela doença normalmente caem precocemente no solo. Em condições de alta temperatura e umidade, as lesões apresentam um crescimento aveludado escuro composto por frutificações do patógeno (PEREIRA; CARVALHO; PINHEIRO, 2013; INOUE-NAGATA et al., 2016).

2.4.1.1.4 Controle

A prevenção da entrada do patógeno causador da pinta-preta na área de cultivo é fundamental, uma vez que após seu estabelecimento na planta o controle é difícil e oneroso. Quando presente na área, a doença pode ser controlada por três medidas: práticas culturais, tratamento com fungicidas e uso de variedades resistentes. Práticas culturais e tratamento fungicida são as medidas mais comuns,

dada a ausência de cultivares comerciais efetivamente resistentes (BALBI-PEÑA et al., 2006). A herança de resistência à pinta-preta ser do tipo poligênica e sua associação a características hortícolas indesejáveis dificultam e lenteiam as linhas de melhoramento genético da resistência à doença em tomate (ADHIKARI; OH; PANTHEE, 2017).

No Brasil, a utilização de sementes e mudas saudáveis e/ou tratadas com fungicidas, a escolha do local e época de plantio com menores umidade e precipitação acumuladas e principalmente o uso de fungicidas constituem as principais medidas de controle do patógeno. O uso de cobertura plástica em cultivo protegido também é capaz de diminuir a incidência de pinta-preta, pois desfavorece a esporulação do patógeno e o progresso da doença. Além disso, a rotação de culturas com plantas não hospedeiras, a incorporação dos restos culturais imediatamente após a colheita, a adoção de maiores espaçamentos de plantio, realização de irrigações preferencialmente por gotejamento, eliminação de hospedeiras alternativas, adubação equilibrada e a adoção de cobertura do solo com palhada são medidas que contribuem para uma maior sanidade e resistência da planta em suportar a infecção pelo patógeno e reduzem a disseminação da doença, pois evitam a dispersão e sobrevivência do patógeno na área (INOUE-NAGATA et al., 2016).

Com base nos meios atualmente disponíveis, o controle químico da pinta-preta deve ser realizado por meio de aplicações preventivas de fungicidas protetores ou cúpricos no início do período vegetativo. Tais produtos formam uma película protetora no filoplano e agem sobre múltiplos sítios do metabolismo do fungo, impedindo a infecção do patógeno e dessa forma o surgimento de raças resistentes. Entretanto, devem ser aplicados frequentemente, pois a planta emite novas folhas que ficam desprotegidas, além da perda de produtos por escoamento sob chuva. Quando a doença atinge incidências maiores, recomenda-se a aplicação de fungicidas sistêmicos para seu controle curativo (triazóis, estrobilurinas, dicarboxamidas) alternados com fungicidas protetores (cúpricos, isoftalonitrila, ditiocarbamatos) (PEREIRA; CARVALHO; PINHEIRO, 2013; INOUE-NAGATA et al., 2016).

A rotação de ingredientes ativos de produtos sistêmicos ou sua mistura com fungicidas de contato devem ser adotadas a fim de evitar o surgimento de resistência pelo patógeno. Somente fungicidas registrados no Ministério da

Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para o controle da pinta-preta em tomateiro podem ser recomendados e utilizados. No Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT, 2019), encontram-se registrados 179 produtos comerciais para o controle da doença, dos quais 39 são de natureza inorgânica, à base de hidróxido ou oxicleto de cobre, e apenas um é biológico (*Bacillus pumilus* QST 2808). Ainda, de acordo com o sistema da Agência de Defesa Agropecuária do Paraná (ADAPAR, 2019), 114 produtos comerciais encontram-se liberados para uso na cultura do tomate no estado do Paraná, dos quais 6 são de origem estritamente inorgânica e 2 de natureza biológica (*Bacillus amyloliquefaciens* e *B. pumilus* QST 2808).

2.4.2 *Botryotinia squamosa*

A queima-das-pontas é uma das mais frequentes e importantes doenças da cebola. O diagnóstico da doença pode ser muitas vezes confundido com sintomas causados por seca, ataque por tripes, excessiva umidade do solo e o difícil isolamento do fungo. A doença pode causar prejuízos em função das condições climáticas prevalentes e da suscetibilidade das cultivares plantadas. Acomete mudas com maior agressividade em fase de canteiros em época fria e úmida, podendo causar a morte de mais de 50% das mudas. Epidemias da doença na cultura são observadas com maior intensidade em épocas úmidas, de baixa temperatura e pouca luminosidade (MASSOLA JR et al., 2016; ARAÚJO; ALVES; HIGASHIKAWA, 2017).

2.4.2.1 Queima-das-pontas da cebola

2.4.2.1.1 Etiologia

O agente causal da doença é o fungo *Botrytis squamosa* Walker, cujo micélio é septado, hialino, com ramificações que podem dar origem a conidióforos que sustentarão os conídios. O fungo pode formar escleródios de 3 a 10 mm sobre restos de cultura ou na região do pescoço dos bulbos de plantas afetadas.

A forma perfeita do fungo corresponde a *Botryotinia squamosa* Vien-Bourg. (CARRISSE et al., 2011; MASSOLA JR et al., 2016).

2.4.2.1.2 Epidemiologia

O fungo sobrevive associado à semente ou no solo sob a forma de escleródios, geralmente formados em tecido foliar morto, por mais de dois anos. Sobrevive também na forma de micélio dormente e em restos de cultura. Os conídios do fungo são liberados principalmente no período da manhã e disseminados por meio do vento. A doença é favorecida por baixas temperaturas e alta umidade, sendo a faixa ótima para a germinação dos conídios de 20 a 28 °C e para a infecção de 15 a 20 °C. Um período de molhamento foliar superior a 9 horas é necessário para que haja a germinação e esporulação do fungo. Em condições muito secas, a doença praticamente desaparece, mesmo na presença de muitas manchas esbranquiçadas na superfície foliar. Folhas mais velhas são mais suscetíveis à infecção porque o fungo não consegue penetrar diretamente pela superfície de folhas jovens. A penetração e a colonização do patógeno também são favorecidas em plantas com pouca cerosidade nas folhas (MASSOLA JR et al., 2016; ARAÚJO; ALVES; HIGASHIKAWA, 2017).

2.4.2.1.3 Sintomatologia

Os sintomas da doença são observados na forma de pequenas manchas esbranquiçadas com cerca de 2 mm de diâmetro no limbo foliar, circundadas por halos prateados, permanecendo verde o restante do tecido. Em condições de alta umidade, as manchas permanecem isoladas e aumentam de tamanho. Pode ocorrer a morte progressiva dos ponteiros, do ápice para a base da folha, que se torna podre e escura. Sobre a área lesionada, observa-se intensa esporulação do fungo, de aspecto translúcido, nas primeiras horas da manhã. As lesões nas folhas normalmente ocorrem quando os bulbos ainda não estão totalmente formados, o que faz com que estes permaneçam pequenos, com os tecidos do pescoço amolecidos (CARRISSE et al., 2011; MASSOLA JR et al., 2016).

2.4.2.1.4 Controle

As medidas de controle da queima-das-pontas devem priorizar a redução do inóculo inicial, mediante o uso da rotação de culturas por, no mínimo, dois anos, tanto na área a ser implantada a lavoura como nos canteiros de produção de mudas. A área de produção de mudas deve priorizar a boa ventilação a fim de reduzir o período de molhamento foliar. A escolha de cultivares com maior cerosidade nas folhas é preferível visto que são mais resistentes à infecção pelo patógeno. A irrigação, quando feita por aspersão, deve ser realizada no período da manhã, a fim de permitir a secagem rápida das folhas. Pulverizações com fungicidas à base de captana e mancozebe podem ser utilizados no controle da doença (CARRISSE et al., 2011; MASSOLA JR et al., 2016).

No sistema AGROFIT (2019) encontram-se registrados 3 produtos comerciais para o controle da doença, todos de natureza química. No sistema ADAPAR (2019) constam igualmente 3 produtos comerciais liberados para uso na cultura da cebola, sendo 1 de natureza biológica (*B. amyloliquefaciens* MBI600 - Durável®).

2.4.3 *Colletotrichum lindemuthianum*

A antracnose do feijoeiro, causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, é uma doença que causa grande apreensão nos dias de hoje, não apenas pelo impacto econômico, mas também pela propensão de devastar colheitas em pouco tempo, quando as condições ambientais são favoráveis ao patógeno. As perdas de rendimento podem variar de 20 a 100% de acordo com as condições climáticas e a sanidade das sementes. A severidade da doença é tanto maior quanto mais precoce for o seu aparecimento na lavoura. Além de diminuir o rendimento da cultura, essa doença pode causar manchas nos grãos, depreciando a qualidade do produto e seu valor comercial (BARBOSA; GONZAGA, 2012; COSTA et al., 2015).

2.4.3.1 Antracnose do feijoeiro

2.4.3.1.1 Etiologia

O fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. e Magnus), pertencente ao filo dos *Ascomycota*, classe *Sordariomycetes*, ordem *Glomerellales* e família *Glomerellaceae* (MycoBank, 2019), se reproduz de forma assexuada, produzindo conídios num corpo de frutificação denominado acérvulo, podendo também formá-los em ramificações laterais do micélio. Os conídios produzidos nos acérvulos estão envolvidos por uma matriz gelatinosa constituída de polissacarídeos e proteínas solúveis em água (MENEZES, 2006). Os conídios formam massas de cor salmão ou mel no meio de cultura, sendo unicelulares, hialinos e retos ou cilíndricos, medindo em torno de 10,5 x 4 µm. Por ocasião da germinação, um conídio pode emitir um ou mais tubos germinativos, que podem formar apressórios em seus ápices ou continuar crescendo, formando as hifas. Os apressórios são marrom-escuros e ovais, medindo 8 x 6-7 µm, não formando complexos. O micélio de *C. lindemuthianum* é septado e ramificado, com coloração variando de hialina a quase negra (SUTTON, 1992).

O fungo coloniza intracelularmente os tecidos da planta e age de maneira hemibiotrófica. Nos estágios iniciais da infecção, os conídios germinam na superfície da planta, produzindo tubos germinativos e apressórios que penetram na diretamente através da cutícula. Com o processo de colonização do patógeno, nos tecidos da planta afetada surgem os sintomas de antracnose, visíveis em folhas, inflorescências e frutos, sendo a doença mais severa em regiões tropicais e subtropicais (PAULA JÚNIOR; VENZON, 2007). Nas vagens a esporulação do fungo é abundante em temperaturas que variam entre 14 e 18 °C.

Damasceno Silva, Souza e Ishikawa (2007) relatam que aproximadamente 50 raças fisiológicas de *C. lindemuthianum* foram identificadas no Brasil, dentre as quais 65, 73 e 81 destacam-se como as mais frequentes, considerando a virulência.

2.4.3.1.2 Epidemiologia

O fungo sobrevive em restos culturais e tem nas sementes infectadas seu principal meio de sobrevivência, através de micélio dormente dentro do tegumento, e de disseminação, a qual também pode se dar através de respingos de chuva, insetos e o homem. É uma doença cosmopolita, ocorrendo em locais de temperatura baixa a moderada (entre 13 e 27 °C sendo 21 °C a temperatura considera ótima) e umidade relativa acima de 91% (COSTA et al., 2015).

Após o contato inicial com a superfície foliar, sob condições favoráveis, os conídios germinam em um período de 6 a 9 horas, formando o tubo germinativo e o apressório (WENDLAND et al., 2016). Após a penetração nos tecidos da folha, *C. lindemuthianum*, apresenta dois estádios de infecção: uma fase inicial biotrófica e uma fase secundária necrotrófica.

2.4.3.1.3 Sintomas

Os sintomas da antracnose podem ser observados em todas os órgãos da planta. Nas plântulas as lesões dos cotilédones são amarronzadas ou negras, sendo que no hipocótilo apresentam-se alongadas, superficiais ou deprimidas, capazes de causarem a morte da plântula. Por sua vez, as folhas exibem sintomas nas nervuras com lesões necróticas de coloração marrom-escura na face inferior, enquanto que as lesões no caule e nos pecíolos são parecidas às exibidas no hipocótilo, podendo apresentar cancros. Na vagem as lesões tendem a ser circulares e deprimidas, de coloração marrom, com os bordos escuros e salientes, circundados por um anel pardo-avermelhado. Vagens sintomáticas podem dar origem a sementes infectadas, apresentando lesões marrons ou avermelhadas (WENDLAND et al., 2016).

2.4.3.1.4 Controle

O controle da antracnose do feijoeiro baseia-se, sobretudo, no emprego de sementes de boa qualidade. Assim, o tratamento de semente com fungicidas e pulverizações destes produtos ao longo do ciclo da cultura

(MANJUNATH et al., 2016) são medidas amplamente adotadas. Dada a grande variabilidade genética do patógeno, o uso de cultivares com maiores níveis de resistência às raças comuns na região de cultivo também é importante. Ainda, a rotação de culturas e a eliminação dos restos culturais são medidas essenciais para o rompimento do ciclo do patógeno (WENDLAND et al., 2016).

Dada a presença de infestação na lavoura, o controle da antracnose no feijoeiro ocorre principalmente através do uso de agroquímicos. De acordo com a base de dados do sistema AGROFIT (2019), existem 153 produtos comerciais recomendados para uso dos quais 3 são de origem estritamente inorgânica (cúpricos) e 1 de natureza microbiológica (*B. pumilus* QST 2808 - SONATA®). Em contrapartida, o estado do Paraná apresenta 96 fungicidas liberados para uso na cultura do feijoeiro, apresentando o mesmo produto biológico citado e sem registros de ativos inorgânicos.

2.4.4 *Gibberella zeae*

O fungo *F. graminearum* (Schwabe) (teleomorfo *Gibberella zeae* (Schwein) Petch), tem sido frequentemente encontrado infectando colmos e espigas de milho e ocorre com maior frequência em regiões de clima temperado e de alta umidade relativa. A ocorrência de chuvas frequentes ao fim do ciclo da cultura aumenta a incidência desta podridão, sobretudo em cultivares cujas espigas não se voltam para baixo após a maturidade fisiológica. Os sintomas se iniciam por meio de uma massa cotonosa avermelhada na ponta da espiga, podendo evoluir até a base (CARVALHO; PEREIRA; CAMARGO, 2016).

As palhas de revestimento ficam fortemente aderidas à espiga por conta do excessivo crescimento micelial entre as brácteas e os grãos. Além de *F. graminearum* sobreviver nas sementes na forma de micélio dormente, o cultivo do milho em sucessão aos restos culturais de cereais de inverno colonizados pelo fungo pode garantir a manutenção do inóculo na área e facilitar a infecção das plantas de milho (REIS; CASA; BIANCHINI, 2011). A depreciação causada pelo ataque do patógeno nos grãos é responsável por perda de qualidade do produto final, pois além de apresentarem menor enchimento de grãos, podem conter micotoxinas como

zearalenona e desoxinivalenol, causando a depreciação do produto final (REIS; CASA; BIANCHINI, 2011).

2.4.4.1 Podridão rosada da espiga do milho

2.4.4.1.1 Etiologia

O agente causal é *Gibberella zeae*, que tem como forma imperfeita *Fusarium graminearum*. Os peritécios são esféricos, pretos, produzidos na superfície do colmo doente e possuem ascos com 8 ascósporos. Estes são hialinos, apresentam 3 septos e são geralmente curvos, medindo de 3-5 x 20-30 µm. Os macroconídios de *F. graminearum* são igualmente hialinos, curvos e medem de 4-6 x 30-60 µm. Clamidósporos podem ser produzidos. O fungo, além do milho, tem trigo, cevada e outros cereais como hospedeiro (CARVALHO; PEREIRA; CAMARGO, 2016).

2.4.4.1.2 Epidemiologia

O fungo sobrevive em hospedeiros alternativos e nos restos culturais na forma de micélio. Sob condições ambientais favoráveis, estes liberam conídios que são transportados pelo vento e pela chuva. A infecção tem início quando os esporos fúngicos entram em contato com os estilo-estigmas das plantas. A exteriorização do estilo-estigma ou ferimentos nos grãos do milho são as principais vias de infecção do patógeno (REID; HAMILTON; MATHER, 1996). Condições de temperatura de 24 °C a 26 °C e períodos de molhamento persistente favorecem a infecção do patógeno (REID; HAMILTON; MATHER, 1996).

As toxinas produzidas por *Fusarium* spp. são sintetizadas em condições de baixas temperaturas, o que indica que esses fungos as produzem quando submetidos a choque térmico, principalmente com alternância das temperaturas diurna e a noturna (CARVALHO; PEREIRA; CAMARGO, 2016).

2.4.4.1.3 Sintomas

Sintomas típicos de podridão rosada da ponta da espiga ocorrem devido à colonização dos grãos pelo crescimento do micélio do fungo de cor rosa, que pode progredir em direção a base da espiga (CASA et al., 2012). Infecções por *F. graminearum* reduzem a produtividade e a qualidade dos grãos. Pode ocorrer produção de micotoxinas principalmente da classe dos tricotecenos-B (DESJARDINS; PROCTOR, 2011).

2.4.4.1.4 Controle

A ampla gama de hospedeiros de *F. graminearum* cria condições para a manutenção da densidade e do potencial de inóculo do fungo nas mais distintas condições edafoclimáticas em que o milho é cultivado, o que dificulta adoção de estratégias eficientes de manejo por práticas culturais adotadas pelo produtor. Ainda assim, a utilização de cultivares com maior nível de resistência e que tenham espigas decumbentes, adoção de correta densidade de plantio, manutenção da cultura livre de plantas daninhas e a rotação de culturas, principalmente evitando plantios sucessivos de milho, são estratégias a serem exploradas para o manejo da doença (CARVALHO; PEREIRA; CAMARGO, 2016).

Em relação ao controle químico há poucos produtos registrados para o controle do fungo. De acordo com o sistema AGROFIT (2019), para a cultura do milho existe apenas um produto comercial registrado (FIRMEZA®), enquanto que 60 produtos para a cultura do trigo, maior alvo do patógeno. O sistema Adapar (2019), por sua vez, apresenta 32 produtos liberados para o controle do patógeno sem especificar cultura agrícola, sem nenhum produto microbiológico registrado. Cabe lembrar que aplicações de fungicidas são em sua maioria direcionadas apenas para controle de doenças foliares e não para patógenos específicos que colonizam as espigas (JULIATTI et al., 2007; BRITO et al., 2012).

2.4.5 *Rhizoctonia solani*

O fungo *Rhizoctonia solani* Kuhn (teleomorfo: *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk) está classificado no filo *Basidiomycota*, classe *Agaricomycetes*, família *Ceratobasidiaceae* e apresenta 14 registros de *formae speciales* associados a hospedeiros específicos (MycoBank, 2019). Este fitopatógeno está comumente relacionado à podridão de pré-emergência e ao tombamento em pós-emergência, sintoma mundialmente conhecido como damping-off. Ocorre naturalmente no solo de maneira saprofítica e/ou exercendo parasitismo sobre diversas culturas anuais ou perenes e podem ocorrer como endófitos simbioses em orquídeas e musgos (AJAYI-OYETUNDE; BRADLEY, 2017). Este fungo é o principal agente causal de damping-off para a cultura do tomateiro e é um patógeno agressivo tanto em condições de campo quanto em cultivo protegido (PAVAN et al, 2016).

2.4.5.1 Tombamento de mudas

2.4.5.1.1 Etiologia

A identificação de *Rhizoctonia* spp. é feita pela observação de hifas multinucleadas, as quais formam ângulos de noventa graus em suas ramificações. As espécies apresentam grande diversidade e, somente por meio da caracterização de grupos de anastomose (AG) e de grupos intraespecíficos (ISG), torna-se possível a obtenção de dados da variação genética existente nesse gênero (SNEH; BURPEE; OGOSHI, 1991). A anastomose de hifas é um fenômeno comum e o cariótipo da célula anastomosada reflete a relação genética dos núcleos componentes. Quando os núcleos são geneticamente idênticos, a fusão entre duas hifas da mesma cultura monoconidial resulta numa célula homocariótica. Por outro lado, quando há anastomose de hifas dotadas de núcleos geneticamente diferentes, a célula resultante é heterocariótica (MENEZES, 2006).

O melhoramento de variedades resistentes às doenças causadas por fungos desse gênero foi iniciado a partir da identificação dos AGs e ISGs devido à grande diversidade de hospedeiros e às diferenças entre isolados não serem

evidentes. Desse modo, estratégias para programas de melhoramento foram estabelecidas com o avanço nesses conceitos, visto que o patógeno causador de determinada doença numa planta estar relacionado a um AG ou ISG específico. Além disso, as distinções taxonômicas entre AG ou ISG de *R. solani* estão muitas vezes associadas a diferenças ecológicas e epidemiológicas (OGOSHI, 1987).

A classificação de um espécime dentro do gênero *Rhizoctonia* leva em conta a presença de várias características, dentre elas a ramificação observada próxima ao septo distal em hifas jovens; existência de um septo na ramificação da hifa perto do seu ponto de origem; septos do tipo doliporo; ramificações de hifas que são concêntricas em sua extremidade basal; grampos de conexão inexistentes; ausência de conídios; tecido esclerocial sem diferenciação entre membrana, córtex e medula; ausência de rizomorfos; e morfologia do teleomorfo *Thanatephorus cucumeris* (SNEH; BURPEE; OGOSHI, 1991).

2.4.5.1.2 Epidemiologia

O fungo não apresenta esporulação na sua fase anamórfica. Sobrevive no solo na forma de estruturas globulosas denominadas escleródios que podem permanecer viáveis por longos períodos. Temperaturas entre 10 e 21 °C, alta umidade relativa do ar e umidade do solo, solos mal drenados, irrigações excessivas, alta densidade populacional na semeadura e alto teor de matéria orgânica, adubação nitrogenada em excesso, cultivos sucessivos no mesmo local e pH ácido favorecem a ocorrência da doença (AJAYI-OYETUNDE; BRADLEY, 2017).

2.4.5.1.3 Sintomas

Os sintomas apresentados por *R. solani* variam de acordo com os órgãos dos hospedeiros infectados e podem ser confundidos com aqueles causados por outros patógenos (OLIVEIRA et al., 2008). De acordo com Inoue-Nagata et al. (2016), o tombamento de mudas ou "damping-off" é um termo genérico utilizado para designar a ocorrência da morte das sementes durante a fase de germinação ou da plântula após sua emergência. A doença causa infecção nos tecidos vegetais ainda dependentes ou recém-liberados das reservas nutricionais acumuladas nas

sementes. Também estão incluídas neste grupo as podridões que ocorrem nas sementes quando essas são colocadas no solo e após seu entumescimento, período mais suscetível ao ataque de patógenos. No "damping-off" de pré-emergência pode ocorrer a morte das sementes, que se caracteriza por necroses e pela perda de rigidez nos tegumentos e consequente apodrecimento. Se as plântulas são infectadas após a emergência, morrem devido ao anelamento do coleto, muitas vezes resultando em constrição do tecido vegetal junto à superfície do solo ("damping-off" de pós-emergência) fazendo com que o caule não suporte o peso da plântula, ocasionando seu tombamento e morte (LOPES; AVILA, 2005).

2.4.5.1.4 Controle

Várias formas de controle vêm sendo testadas para a contenção da doença, como o uso de variedades resistentes, controle químico (LE COINTE et al., 2016), compostos voláteis de plantas (NAWROCKA et al., 2018) e controle biológico (PATIL et al., 2010; SUMIDA; BALBI-PEÑA, 2013; GOUDJAL et al, 2014; LIU, 2017; RAJENDRAPRASAD, 2017). Seu controle é dificultado pela grande variabilidade da população do patógeno e sua capacidade de sobrevivência por longos períodos no solo. A associação de rotação de culturas e métodos que visam minimizar o contato da planta com o fungo não são eficazes o suficiente para a contenção do patógeno e precisam ser associados a outras formas de controle (MONTEALEGRE et al., 2003).

Não há fungicidas químicos registrados para o controle da doença na tomaticultura (AGROFIT, 2019), sendo contempladas apenas as culturas da acelga, alcachofra, alface, algodão, alho, amendoim, arroz, batata, berinjela e eucalipto. Cabe ressaltar a urgência por pesquisas voltadas ao controle de doenças em hortaliças de modo geral, as quais normalmente apresentam ciclo curto de produção e por isso potencializam os danos na cadeia produtiva quando acometidas por doenças (DARI; ADDO; DZISI, 2016). Em contrapartida, existem 9 fungicidas de caráter microbiológico disponíveis no mercado para uso em quaisquer culturas acometidas por *R. solani* (Tabela 1).

Tabela 1 - Fungicidas microbiológicos liberados para controle de *Rhizoctonia solani* para o estado do Paraná.

Nome Comercial	Microrganismo	Classificação Toxicológica	Empresa Registrante
DURAVEL	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MBI600	III - Medianamente Tóxico	Basf S.A.
ECOTRICH WP ^a	<i>Trichoderma harzianum</i> IBLF006	IV - Pouco Tóxico	Ballagro Agro Tecnologia Ltda
MAJESTIC	<i>Trichoderma harzianum</i> IBLF006	IV - Pouco Tóxico	Ballagro Agro Tecnologia Ltda
PREDATOX	<i>Trichoderma harzianum</i> IBLF006	III - Medianamente Tóxico	Ballagro Agro Tecnologia Ltda
QUALITY	<i>Trichoderma asperellum</i> SF04	III - Medianamente Tóxico	Laboratório De Bio Controle Farroupilha Ltda
SERENADE	<i>Bacillus subtilis</i> QST 713	III - Medianamente Tóxico	Bayer S.A.
TRICHO-TURBO	<i>Trichoderma asperellum</i> BV-10	IV - Pouco Tóxico	Biovalens Ltda
TRICHODERMAX E ^b	<i>Trichoderma asperellum</i>	IV - Pouco Tóxico	Novozymes BioAg Produtos para Agricultura Ltda.
TRICHODERMIL SC 1306 ^c	<i>Trichoderma harzianum</i> ESALQ-130	III - Medianamente Tóxico	Koppert Do Brasil Holding Ltda

Fonte: Agência da Defesa Agropecuária do Paraná (ADAPAR); janeiro de 2019. ^aDe acordo com a bula, registrado apenas para as culturas de alface e soja. ^bEficiência agrônômica comprovada apenas para as culturas da soja e feijão; ^cEficiência agrônômica comprovada apenas para as culturas do feijão e morango.

2.5 A CULTURA DO TOMATEIRO

Dentre os vegetais consumidos pelo homem, o tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é o de segunda maior produção na olericultura mundial, amplamente cultivado e consumido ao redor do globo, com 182,3 milhões de toneladas produzidos em 2017, ficando atrás apenas da batata e superando os cultivos de cebola e pimentas (FAOSTAT, 2019). O Brasil ocupa a décima posição na produção mundial de tomate sendo que na safra 2018 a produção nacional foi de 4.084.910 toneladas, sendo Goiás, São Paulo, Minas Gerais e Paraná os estados de maior produção do fruto (IBGE, 2019).

Os frutos do tomateiro são ricos em minerais, vitaminas, aminoácidos essenciais, açúcares e fibras dietéticas e podem ser consumidos *in natura*, desidratados, na forma de molhos, pastas, doces, sucos e outros. Considerando que o tomate cru, com semente, possui um percentual de 95% de umidade, a ingestão de 100 g do alimento representa o aporte de 15 Kcal de energia, 1,1 g de proteínas, 0,2 g de lipídeos, 3,1 g de carboidratos, 1,2 g de fibras

alimentares, 7 mg de cálcio, 11 mg de magnésio, 20 mg de fósforo, 222 mg de potássio e 21,2 mg de vitamina C (TACO, 2011).

Plantas de tomate apresentam dois hábitos de crescimento distintos, os quais determinam a destinação comercial do seu cultivo. Materiais com crescimento determinado têm hábito rasteiro e cessam o desenvolvimento após a florescência, necessitando de estaqueamento apenas durante período de chuvas, a fim de evitar o contato dos frutos com o solo e, conseqüentemente, o aparecimento de pragas e doenças (NAIKA et al., 2006; PERALTA; SPOONER, 2007). Cultivares com hábito indeterminado podem chegar a 2,5 m de altura e apresentam grande quantidade de folhas, que se sobrepõem aos frutos. Por conseguinte, devem ser tutoradas a fim de facilitar os tratos culturais. Assim, plantas de crescimento determinado têm produção voltada ao aproveitamento industrial enquanto as de hábito indeterminado são destinadas ao consumo *in natura* (NAIKA et al., 2006; PERALTA; SPOONER, 2007).

A cultura do tomate é suscetível a mais de 200 enfermidades de plantas, tanto em pré como em pós-colheita (AGRIOS, 2005). O tombamento ou damping-off é uma das doenças mais comuns desta solanácea, sendo causado principalmente por oomicetos pertencentes ao gênero *Pythium* e ao fungo *Rhizoctonia solani* (PAVAN et al, 2016). Devido à grande vulnerabilidade da cultura a doenças, as quantidades de agrotóxicos empregadas para o seu controle são expressivas (ALVARENGA, 2004; FAEG, 2016).

De acordo com dados do relatório do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA, publicado pela Anvisa (2016), do total de 730 amostras de tomate analisadas, 200 (27,3%) apresentaram agrotóxicos não autorizados para uso na tomaticultura e 62 (8,5%) apresentaram resíduos em concentrações acima do limite máximo de resíduo permitido. Dentre os problemas gerados pela utilização abusiva de agrotóxicos podem ser citadas a seleção de populações de microrganismos resistentes ao princípio ativo; a redução ou mesmo a eliminação da microbiota benéfica; a contaminação de aquíferos; e o longo tempo de persistência e permanência de alguns desses compostos no solo e, ou, em órgãos vegetais (BETTIOL, 2003). Assim, a busca por produtos eficientes no controle de doenças e de baixa toxicidade e periculosidade ambiental são de suma importância para a cultura, tais quais os produtos de origem biológica.

3 ARTIGO A

CONTROLE *IN VITRO* DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS E DE TOMBAMENTO DE MUDAS DE TOMATEIRO POR *Bacillus velezensis* LABIM40

3.1 RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar o antagonismo exercido pela bactéria *Bacillus velezensis* LABIM40 contra os fungos *Alternaria linariae* (AL), *Botryotinia squamosa* (BS), *Colletotrichum lindemuthianum* (CL), *Gibberella zeae* (GZ) e *Rhizoctonia solani* (RS) em condições *in vitro*, o efeito de promoção de crescimento de plantas de tomateiro e o controle do tombamento causado por *R. solani* em câmara de crescimento de plantas, através de tratamento de sementes à base de suspensão de células da LABIM40, sobrenadante de cultivo livre de células (SLC), SLC de LABIM40 concentrado dez vezes (SLCx10), produto comercial à base de *Bacillus amyloliquefaciens* (PC_1), produto comercial à base de *Bacillus subtilis* (PC_2) e controle (água deionizada estéril), aos 21 dias após a semeadura (DAS). Os ensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial. Em teste de cultura dupla constatou-se antibiose da bactéria sobre todos os fungos. Quando confrontados com o SLC da cepa LABIM40 em teste de difusão em poço em meio solidificado, verificou-se inibição de 46,6; 67,4; 64,7; 49,0 e 54,4% no crescimento micelial de AL, BS, CL, GZ e RS, respectivamente. A concentração inibitória mínima (CIM) para cada fungo foi determinada através do emprego de diferentes concentrações de SLC incorporado ao meio BDA, seguido de análise de regressão das respostas de inibição de crescimento micelial. Com exceção de *A. linariae*, todos os fungos obtiveram resultados ajustados a modelos logarítmicos. Em teste de germinação de sementes *in vitro* apenas o tratamento à base de SLCx10 apresentou resultado estatisticamente inferior ao controle, sugerindo um efeito fitotóxico deste tratamento aplicado na semente. Em ensaio em câmara de crescimento de plantas, os produtos foram avaliados sobre o controle do tombamento em plântulas semeadas em substrato estéril e inoculado com *R. solani* e sobre a promoção de crescimento de plântulas aos 21 DAS. As sementes apresentaram 80% de germinação em substrato estéril e 38% quando inoculado com *R. solani*, não diferindo estatisticamente entre tratamentos. Na presença do fungo no substrato, SLCx10 teve sobrevivência de plântulas 36% superior ao tratamento controle, sendo estatisticamente superior aos demais produtos testados. Não foi verificado efeito de promoção de crescimento em plantas através do comprimento de caule e raiz e massa de plantas, que foram em média 34,05, 17,08 e 31,2% menores quando o cultivo foi realizado na presença do fungo. Concluiu-se que a cepa LABIM40 apresenta capacidade de inibir *in vitro* o crescimento micelial das cinco espécies de fungos fitopatogênicos e determinou uma sobrevivência de plântulas aos 21 DAS 36% superior ao controle em ensaio inoculado com *R. solani* e conduzido em câmara de crescimento. A bactéria e seu SLC não promoveram crescimento de plantas através do tratamento de sementes de tomateiro.

Palavras-chave: Controle biológico, rizobactérias promotoras do crescimento de plantas, *Rhizoctonia solani*, *Solanum lycopersicum*.

3.2 ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the antagonism of *Bacillus velezensis* LABIM40 against *Alternaria linariae*, *Botryotinia squamosa*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Gibberella zeae* and *Rhizoctonia solani* fungi under *in vitro* conditions and the effect of plant growth-promoting in tomato and control of damping-off caused by *R. solani* in a plant growth chamber, by seed treatment with LABIM40 cell suspension, cell-free culture supernatant (SLC), LABIM40 10 times concentrated SLC (SLCx10), two commercial products based on *Bacillus amyloliquefaciens* (PC_1) and *Bacillus subtilis* (PC_2) and control (sterile deionized water) at 21 days after sowing (DAS). The trials were conducted in a completely randomized design and were evaluated in a factorial scheme. In a dual culture test, bacterial antibiosis was observed over the fungi, then comparing with the agar well diffusion test with LABIM40' SLC, which inhibited in 46,6, 67,4, 64,7, 49,0 and 54,4% the mycelial growth of the mentioned species, respectively. The minimum inhibitory concentration (MIC) for each fungus was determined by employing different concentrations of SLC incorporated in BDA media, followed by regression analysis of mycelial growth inhibition responses. In exception of *A. linariae*, all fungi obtained results adjusted to logarithmic models. In seeds germination test only the treatment based on SLCx10 presented a statistically lower result than the control, suggesting a phytotoxic effect of the concentrated SLC applied to the seed. In plant growth chamber tests, treatments were evaluated on the control of damping-off in seedlings cultivated on sterile substrate and inoculated with *R. solani* and on the promotion of plant growth at 21 DAS. The treatments presented 80% of germination in sterile substrate and 38% when inoculated with *R. solani*, not statistically different from each other. In the presence of the fungus in the substrate, SLCx10 had survival 36% higher than the control treatment, being statistically superior to the other products tested. No effect of plant-growth promotion was verified by measuring stem length and roots and plant mass, which were on average 34.05, 17.08 and 31.2% lower when the cultivation was carried out in the presence of fungus. It was concluded that the LABIM40 strain has the capacity to inhibit the mycelial growth of the five phytopathogenic fungi tested in *in vitro* culture and showed a biocontrol of the fungus *R. solani* only in the survival question. The bacteria and its products did not promote plant-growth through the treatment of tomato seeds.

Key words: Biological control, plant-growth promoting rhizobacteria *Rhizoctonia solani*, *Solanum lycopersicum*.

3.3 INTRODUÇÃO

Dentre os vegetais consumidos pelo homem, o tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é o de segunda maior produção na olericultura mundial, amplamente cultivado e consumido ao redor do globo, com 182,3 milhões de toneladas produzidos em 2017, ficando atrás apenas da batata e superando os cultivos de cebola e pimentas (FAOSTAT, 2019). O Brasil ocupa a décima posição na produção mundial de tomate sendo que na safra 2018 a produção nacional foi de 4.084.910 toneladas, sendo Goiás, São Paulo, Minas Gerais e Paraná os estados de maior produção do fruto (IBGE, 2019). Para a continuidade e o aumento da produção desta solanácea, o manejo integrado de doenças na cultura do tomate mostra-se essencial para o bom desenvolvimento das lavouras, dado que a cultura é suscetível a mais de 200 enfermidades de plantas, as quais podem acarretar perdas qualitativas e quantitativas na cadeia produtiva (AGRIOS, 2005).

O fungo *Rhizoctonia solani* é o principal agente causal de tombamento de mudas do tomateiro, sendo um patógeno altamente destrutivo tanto em cultivos a campo quanto em estufa (PAVAN et al, 2016). Seu controle é dificultado pela grande variabilidade da população do patógeno e sua capacidade de sobrevivência por longos períodos no solo (MONTEALEGRE et al., 2003). Além disso, não há fungicidas químicos registrados para o controle da doença na tomaticultura (AGROFIT, 2019).

O uso de organismos vivos como agentes de biocontrole vem ganhando atenção como um método potencial de controle ambientalmente correto, seguro e eficaz contra fitopatógenos (XIANG; LAWRENCE; DONALD, 2018). Neste sentido destacam-se as rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP), bactérias de vida livre que colonizam a rizosfera trazendo efeitos benéficos às plantas, influenciando positivamente em seu crescimento (KHALID; ARSHAD; ZAHIR, 2004; SON et al., 2014), produção (MIA et al., 2010), extração de nutrientes do solo (LIU et al., 2017) e no controle biológico de doenças (SON et al., 2014; CHOWDHURY et al., 2015; PAZ et al., 2018). Dentre todos os gêneros bacterianos que foram identificados como RPCP, *Bacillus* e *Pseudomonas* spp. são os dois gêneros predominantemente investigados (PODILE; KISHORE, 2006).

Neste contexto, o presente trabalho buscou avaliar a habilidade da cepa LABIM40 de *Bacillus velezensis* e de seu sobrenadante de cultivo livre de

células em inibir o crescimento micelial de vários fungos fitopatogênicos em condições *in vitro* e do tombamento de mudas de tomateiro, causado por *R. solani*, além de avaliar se a bactéria apresenta capacidade promotora de crescimento de plantas.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Identificação e origem da bactéria

A bactéria *B. velezensis* LABIM40 foi isolada como um contaminante antagonista de uma placa de cultivo *in vitro* de *Fusarium oxysporum* em Londrina, Brasil. A cepa foi depositada na Coleção Microbiana do Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LaBiM) da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Seu genoma foi sequenciado na plataforma MiSeq, utilizando um kit de reagentes MiSeq versão 3 (600 ciclos, Illumina, Brasil) na Embrapa Soja, Londrina. Este genoma completo foi depositado no DDBJ/EMBL/GenBank sob o número de acesso CP023748 (BAPTISTA et al., 2018).

3.4.2 Origem dos isolados fúngicos e condições de crescimento

A cepa de *Alternaria linariae* AS94 foi cedida pelo Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV-MG). A cepa de *Botryotinia squamosa* EITF10 foi isolada a partir de folhas sintomáticas de cebola na cidade de Ituporanga-SC e cedida pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI). O isolado de *Colletotrichum lindemuthianum* raça 65 foi obtido a partir de vagens de feijoeiro com sintomas típicos de antracnose na cidade de Londrina-PR e cedida pelo Laboratório de Fitopatologia do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR). O isolado de *Gibberella zeae* foi isolado de espigas de milho com grãos apresentando sintomas típicos de podridão de espiga, oriundas de lavouras comerciais do norte do Paraná. Por sua vez, o isolado de *Rhizoctonia solani* foi obtido através do isolamento da região do coleto de plântulas de tomate com sintomas típicos de damping-off para placas de Petri contendo meio batata-dextrose-água (BDA) da marca Acumedia®. A confirmação desta espécie foi

realizada através da observação do micélio típico em microscópio ótico com aumento de 400 vezes, no laboratório de Fitopatologia da UEL.

A fim de manter os microrganismos, todas as espécies fúngicas foram repicadas para meio de cultura BDA e incubadas em estufa incubadora tipo B.O.D à temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. Placas com superfícies totalmente colonizadas pelos fungos foram armazenadas em geladeira à temperatura de 6 °C e ausência de luz. Novos repiques foram feitos previamente à implantação dos experimentos.

3.4.3 Testes *in vitro*

Os ensaios foram conduzidos em estufa incubadora tipo B.O.D (Biochemical Oxygen Demand) e em câmara de crescimento de plantas nos Laboratórios de Biotecnologia Microbiana (LaBiM) e Fitopatologia, da Universidade Estadual de Londrina, iniciados no segundo semestre de 2017 e segundo semestre de 2018, respectivamente.

3.4.3.1 Teste de cultura dupla entre *Bacillus velezensis* LABIM40 e os fungos *Alternaria linariae*, *Botryotinia squamosa*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Gibberella zeae* e *Rhizoctonia solani*

A atividade antagônica da cepa *B. velezensis* LABIM40 foi avaliada contra os cinco fungos em ensaio *in vitro* utilizando o teste de cultura dupla. Para tal, discos de 7 mm de diâmetro de micélio de cada fungo (*A. linariae*, *B. squamosa*, *C. lindemuthianum*, *G. zeae* e *R. solani*) foram colocados no centro de placas contendo meio BDA, com o micélio voltado para baixo. A bactéria foi inoculada encostando uma alça de platina estéril em colônias de 24 horas e colocadas em quatro pontos distanciados de 25 mm do fungo.

As placas controle consistiram em culturas puras de cada espécie fúngica inoculada sob as mesmas condições já citadas. Após 5 dias de incubação em B.O.D. a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas, tempo médio para o completo crescimento do micélio do controle (à exceção do fungo *C. lindemuthianum*, de crescimento mais lento, que não cresceu sobre a área integral da placa), foram

medidos os diâmetros das colônias com base em duas medidas perpendiculares de cada colônia. O cálculo da porcentagem de inibição do crescimento micelial foi realizado de acordo com a equação $ICM (\%) = 100 - [(diâmetro \text{ de colônias fúngicas confrontadas com a bactéria} / diâmetro \text{ médio da colônia da placa controle}) * 100]$. O experimento foi realizado 3 vezes. O delineamento foi inteiramente casualizado com 4 repetições em esquema fatorial 5x2, considerando-se cinco fungos (*A. linariae*, *B. squamosa*, *C. lindemuthianum*, *G. zaeae* e *R. solani*) e presença e ausência de colônias bacterianas da cepa LABIM40.

3.4.3.2 Produção de fermentado livre de células da cepa LABIM40

Após a comprovação do potencial antimicrobiano por meio do teste de cultura dupla, a bactéria seguiu para o processo de produção. Inicialmente, a cepa LABIM40 foi ativada via estriamento em placa de ágar nutriente (AN) a partir da cultura estoque criopreservada, sincronizada após 24 horas por estriamento de uma colônia obtida da placa de ativação e então ajustada à concentração de 10^8 UFC mL⁻¹ em solução salina (NaCl 0,85%) por meio da avaliação de turbidez pela escala de McFarland. Quarenta µL desta suspensão bacteriana foram então inoculados em 40 mL de meio Luria-Bertani (LB) líquido estéril, da marca comercial Kasvi®, a 25 °C e 125 rpm em Shaker Tecnal®. Após 24 horas de cultivo, 4 mL (1%) desta produção foram inoculados em 400 mL de meio de cultura formulado (20 g L⁻¹ de glicose, 5 g L⁻¹ de NaCl, 0,04 g L⁻¹ de MnSO₄.H₂O, 1,67 g L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O, 1,22 g L⁻¹ de MgCl₂.6H₂O, 1,2 g L⁻¹ de K₂HPO₄ e 12,4 g L⁻¹ de triptona) a 28 °C, em pH de 7,1, por 72 horas. Ao longo da produção bacteriana foram retiradas alíquotas de 10 mL a cada 12 horas para a elaboração da curva de crescimento da cepa LABIM40 e testes de atividade antimicrobiana. Dessa forma, a partir de diluições seriadas das alíquotas de cada período e consecutivos estriamentos em placas contendo meio ágar-MYP (Acumedia®) foi possível estabelecer a curva de crescimento microbiano da bactéria através da contagem de UFCs (Unidades Formadoras de Colônias) nas placas. Após o término do cultivo, a produção foi centrifugada a 9.000 rpm por 10 min e o SLC foi filtrado em seringa Millipore de 0,22 µm para fins de esterilização. No fim do processo, parte do produto final obtido foi congelada e a outra foi usada nos ensaios.

3.4.3.3 Teste de difusão em poço

A atividade antifúngica do sobrenadante livre de células (SLC) da cepa LABIM40 foi avaliada contra os fungos alvo usando o método de difusão em poço (SEN; BATRA, 2012). A bactéria foi cultivada como descrito previamente. Em seguida, com o auxílio de uma ponteira de 1000 µL estéril foram feitos 4 poços distanciados de 20 mm do centro, em placas contendo 30 mL de meio BDA já solidificado. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 4 placas utilizadas por fungo, totalizando 16 repetições para cada espécie. No centro de cada placa foi inoculado um disco de micélio de 7 mm de diâmetro, com o micélio voltado para baixo. Os poços foram, então, preenchidos com 200 µL do SLC. Os controles consistiram em placas contendo apenas os discos de cada fungo. As placas foram incubadas em B.O.D a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas até o fechamento do micélio nas placas testemunha. O crescimento micelial foi dado em milímetros com base no diâmetro de duas medidas perpendiculares de cada colônia. O cálculo da porcentagem de inibição do crescimento micelial foi realizado de acordo com a mesma equação empregada no teste de cultura dupla, aqui expresso por ICM (%) = $100 - [(diâmetro\ de\ colônias\ fúngicas\ confrontadas\ com\ o\ SLC\ da\ cepa\ LABIM40 / diâmetro\ médio\ da\ colônia\ da\ placa\ controle) * 100]$. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 16 repetições e analisado em esquema fatorial considerando-se cinco fungos (*A. linariae*, *B. squamosa*, *C. lindemuthianum*, *G. zaeae* e *R. solani*) e presença e ausência de SLC (5x2). O experimento foi executado 3 vezes.

3.4.3.4 Concentração inibitória mínima de crescimento micelial em meio sólido

O teste de concentração inibitória mínima (CIM) foi realizado pelo método de difusão em placas e buscou determinar a mínima concentração do SLC da cepa LABIM40 capaz de inibir 100% do crescimento dos fungos estudados (CLSI, 2009). Os tratamentos foram as diferentes concentrações do SLC incorporado ao meio de cultura BDA, definidos, com base em ensaios preliminares, nas concentrações de 400; 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,562; 0,781 µg mL⁻¹ e testemunha (0,0 µg mL⁻¹) para *B. squamosa* e *R. solani*. Para *A. linariae*, *C.*

lindemuthianum e *G. zea* as concentrações utilizadas foram de 600; 500; 400; 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 0,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O delineamento foi inteiramente casualizado com quatro repetições e o experimento foi executado três vezes. Os dados de inibição do crescimento micelial foram analisados estatisticamente por análise de regressão e ajuste ao melhor modelo com base no coeficiente de determinação (R^2).

3.4.4 Testes *in vivo*

Os testes realizados *in vivo* utilizaram sementes do cultivar de tomateiro Santa Cruz Kada Gigante (Top Seed®), lote 053735, de crescimento indeterminado, com 85% de germinação e com ciclo de 110 a 120 dias.

3.4.4.1 Germinação de sementes tratadas com produtos biológicos

Para preparo do inóculo bacteriano de *B. velezensis* LABIM40, uma alçada de suas colônias foi colocada em tubos de ensaio contendo solução de NaCl (0,85%) e as suspensões foram homogeneizadas em agitador do tipo vórtex. O inóculo bacteriano foi padronizado por meio de comparação visual a aproximadamente 1×10^8 UFC mL^{-1} através da escala de McFarland no momento da realização dos ensaios (NCCLS, 2003). Feito isso, tubos contendo 30 mL da cultura bacteriana da cepa LABIM40 com 24 horas de crescimento foram centrifugados a 9.000 rpm, por 10 minutos a 4 °C. A suspensão final utilizada foi obtida pela ressuspensão dos sedimentos em 3 mL de água destilada esterilizada. Para a obtenção do SLC concentrado dez vezes (SLCx10), uma alíquota de 200 mL de SLC bruto passou por processo de concentração em rotaevaporador Fisatom® até retirar-se uma amostra de 180 mL de água no balão de condensação, obtendo um volume final de 20 mL de SLCx10. Para o produto biológico comercial à base de *B. amyloliquefaciens*, referido nos resultados simplesmente como “PC_1” (produto comercial 1), a dose foi estabelecida com base na recomendação de aplicação prescrita em sua bula (200-300 mL do produto a cada 100 kg de semente de soja) sendo definida como 6 $\mu\text{L g}^{-1}$ de semente de tomate.

As sementes foram desinfestadas superficialmente por imersão por um minuto em solução de álcool 70%, seguida por um minuto em solução de

hipoclorito a 1% e enxaguadas três vezes com água deionizada esterilizada. O efeito da desinfestação superficial foi verificado espalhando-se 200 µL da água final de enxágüe em placas de AN e cultivando em B.O.D. a 35 °C por 48 h. Após secagem, as sementes foram tratadas com as suspensões de *B. velezensis* LABIM40, SLC bruto, SLC concentrado 10 vezes (SLCx10), PC_1 e água deionizada estéril, referente ao tratamento controle. O tratamento de sementes (TS) foi feito via imersão com agitação em Shaker Tecnal® a 125 rpm e temperatura de 25 °C por 10 minutos.

Quatro repetições de 25 sementes por tratamento foram colocadas sobre papel filtro estéril e umidificado com água deionizada autoclavada em placas de Petri, fechadas com parafilme e incubadas a 25 °C em B.O.D com 12h de fotoperíodo. As avaliações de germinação, comprimento de hipocótilo e radícula foram feitas aos 7 dias após o início do teste. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 4 repetições e analisado em esquema fatorial 5x3, considerando-se cinco tratamentos de sementes (controle, suspensão de células da LABIM40, SLC, SLCx10 e PC_1) e três parâmetros (porcentagem de germinação, comprimento de hipocótilo e de radícula). O experimento foi repetido 3 vezes. Na ausência de interação entre os fatores foi feita análise de variância para as médias de cada tratamento e estas foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.4.4.2 Preparo do inóculo fúngico e infestação do substrato

O substrato da marca comercial Basaplant® foi autoclavado três vezes por 40 minutos a 121 °C em intervalos de 24 horas. Bandejas de germinação de 200 células foram preenchidas com substrato esterilizado até a metade de seus volumes. Em seguida, 6 dias antes do plantio das sementes de tomate foram depositados 3 discos de 7 mm de diâmetro de *R. solani* em cada célula, oriundos de colônias puras de 5 dias de crescimento, e depois cobertos com substrato até a superfície da bandeja. O teor de umidade das bandejas foi mantido à capacidade máxima de retenção de água pela adição diária de água filtrada.

3.4.4.3 Controle do tombamento em mudas de tomateiro

Testes de controle do tombamento em mudas foram realizados a partir da germinação de sementes tratadas de tomate cv. Santa Cruz Kada, cultivadas em substrato da marca comercial Basaplant® para mudas. Para cada ensaio foram utilizadas quatro bandejas de 200 células, das quais apenas 180 foram utilizadas. O experimento foi executado duas vezes.

Os produtos utilizados para o tratamento de sementes (exceto o PC_2 que foi aplicado no substrato) no ensaio e suas respectivas concentrações foram: água deionizada esterilizada (controle), suspensão de células da LABIM40 (1×10^8 UFC mL⁻¹), SLC (10 mL g⁻¹ de sementes), SLCx10 (10 mL g⁻¹ de sementes), PC_1 (6 µL g⁻¹ de sementes) e PC_2 (1 mL de produto comercial em 50 mL de água, aplicando-se 5 mL desta solução por célula). Foram utilizados 10 mL de cada produto para seu respectivo tratamento de sementes. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 6 repetições em esquema fatorial 6x2 (6 tratamentos: sem TS, TS com suspensão de células da LABIM40, com SLC, com SLCx10, com PC_1 e aplicação de PC_2 diretamente no substrato e 2 condições de cultivo: substrato estéril e inoculado com *R. solani*). A unidade experimental foi constituída por 20 sementes distribuídas em fileiras com 10 células. Os tratamentos consistiram em: I - Controle positivo, sementes sem tratar em substrato inoculado com *R. solani*; II – Sementes tratadas com suspensão de células da cepa LABIM40 em substrato inoculado com *R. solani*; III - Sementes tratadas com suspensão de células da cepa LABIM40 em substrato estéril; IV - Sementes tratadas com o sobrenadante livre de células (SLC) bruto da LABIM40 em substrato inoculado com *R. solani*. V - Sementes tratadas com SLC bruto da LABIM40 em substrato estéril; VI - Sementes tratadas com SLC da LABIM40 concentrado 10 vezes em substrato inoculado com *R. solani*; VII - Sementes tratadas com SLC da LABIM40 concentrado 10 vezes em substrato estéril; VIII - Sementes tratadas com PC_1 em substrato inoculado com *R. solani*; IX - Sementes tratadas com PC_1 em substrato estéril; X - Sementes cultivadas em células com aplicação de PC_2 em substrato inoculado com *R. solani*; XI - Sementes cultivadas em células com aplicação de PC_2 em substrato estéril; XII – Controle negativo, sementes sem tratar em substrato estéril.

As avaliações da doença foram realizadas a partir da detecção dos primeiros sintomas e foram expressas a partir das porcentagens de germinação de sementes e sobrevivência de mudas ao longo dos 21 dias após a semeadura (DAS).

3.4.5 Efeito dos tratamentos sobre o desenvolvimento vegetativo de plantas de tomateiro

A avaliação da promoção de crescimento de plantas foi realizada aos 21 DAS com base nas medidas de comprimento de caule e raízes e massa de plantas. Estas foram coletadas, limpas de resíduos de substrato e secas em estufa com aeração forçada, mantida à temperatura de 65 °C, até a obtenção de massa constante, determinando-se assim sua massa seca.

Os dados obtidos foram avaliados como no item anterior, submetidos à análise fatorial 6x2 (6 tratamentos em substrato estéril e inoculado com *R. solani*). Quando o efeito dos tratamentos foi significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.4.6 Análise estatística

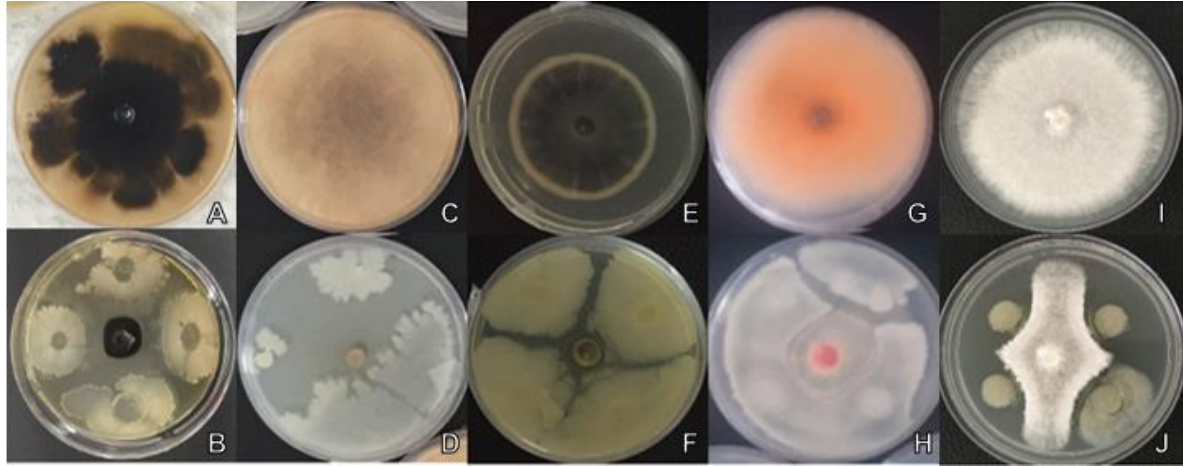
A análise estatística de todos os ensaios foi realizada por meio do software GraphPad Prism® v.8.

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Teste de cultura dupla entre *B. velezensis* LABIM40 e os fungos *Alternaria linariae*, *Botryotinia squamosa*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Gibberella zeae* e *Rhizoctonia solani*

No teste de cultura dupla entre a cepa LABIM40 de *B. velezensis* e os isolados fúngicos (Figura 1) foi constatada interação entre o crescimento micelial de todas as espécies em placas controle e em suas respectivas placas com a presença da bactéria.

Figura 1 - Teste de cultura dupla entre *Bacillus velezensis* LABIM40 e os fungos *Alternaria linariae* (AL), *Botryotinia squamosa* (BS), *Colletotrichum lindemuthianum* (CL), *Gibberella zeae* (GZ) e *Rhizoctonia solani* (RS).



A) Placa controle de AL; B) AL vs. LABIM40; C) Placa controle de BS; D) BS vs. LABIM40; E) Placa controle de CL; F) CL vs. LABIM40; G) Placa controle de GZ; H) GZ vs. LABIM40; I) Placa controle de RS; J) RS vs. LABIM40.

Fonte: O próprio autor.

Quando comparados, os fungos *A. linariae*, *B. squamosa*, *C. lindemuthianum*, *G. zeae* e *R. solani* apresentaram diferença estatística entre si tanto para o crescimento de colônias puras quanto para o teste de cultura dupla. Para o crescimento de colônias puras, os fungos *B. squamosa*, *G. zeae* e *R. solani* obtiveram as maiores médias, estatisticamente iguais, seguidos por *C. lindemuthianum*, por sua vez com crescimento micelial estatisticamente superior ao obtido por *A. linariae* (Tabela 2).

Tabela 2 – Diâmetro micelial de colônias puras (controle) de *Alternaria linariae*, *Botryotinia squamosa*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Gibberella zeae* e *Rhizoctonia solani* e de colônias confrontadas (CD) com a bactéria *Bacillus velezensis* LABIM40.

Placa	Diâmetro micelial (cm)				
	<i>A. linariae</i>	<i>B. squamosa</i>	<i>C. lindemuthianum</i>	<i>G. zeae</i>	<i>R. solani</i>
Controle	6,7 Ca	8,5 Aa	8,0 Ba	8,5 Aa	8,5 Aa
CD ^a	3,6 Cb	2,8 Db	3,0 Db	4,3 Ab	3,9 Bb
CV (%)	10,59	13,39	9,7	15,08	7,27

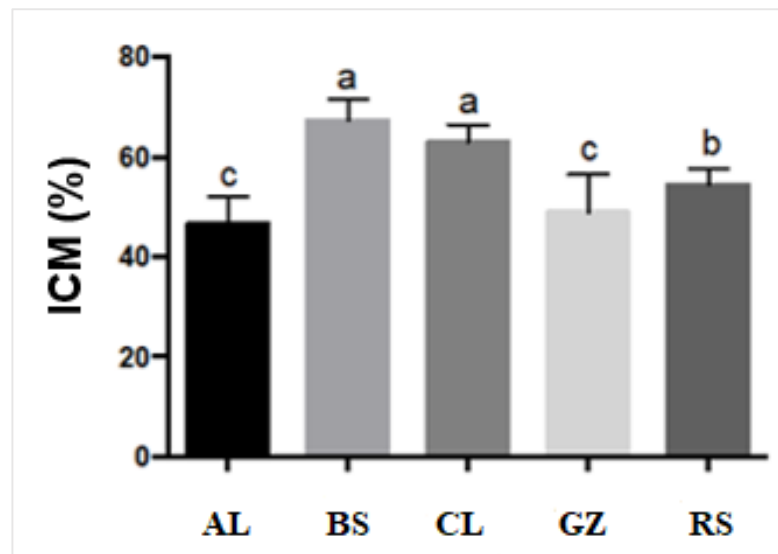
^aCultura Dupla (CD) da espécie fúngica com a cepa LABIM40. *Médias seguidas de letras minúsculas iguais na coluna e letras maiúsculas iguais na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: o próprio autor.

Quando confrontados com a LABIM40, os fungos de maior crescimento – e, portanto, menos inibidos pela bactéria – foram *G. zeae*,

estatisticamente superior a *R. solani*, por sua vez superior a *A. linariae*. As espécies *B. squamosa* e *C. lindemuthianum* apresentaram crescimento micelial estatisticamente inferior às outras, porém equivalentes entre si. Conseqüentemente, em termos de porcentagem de inibição de crescimento micelial (ICM) na presença das colônias bacterianas de LABIM40, *B. squamosa* e *C. lindemuthianum* obtiveram as maiores médias, de 67,4 e 64,7%, respectivamente, estatisticamente iguais entre si e superiores às outras espécies. Tais fungos foram seguidos por *R. solani* com 54,4%, com porcentagem de ICM estatisticamente superior às obtidas por *G. zeae*, com 49,0%, e *A. linariae*, com 46,6%, estatisticamente iguais entre si. Os valores obtidos representam a média dos resultados dos 3 ensaios executados (Figura 2).

Figura 2 – Porcentagem de inibição de crescimento micelial (ICM %) de colônias dos fungos *Alternaria linariae* (AL), *Botryotinia squamosa* (BS), *Colletotrichum lindemuthianum* (CL), *Gibberella zeae* (GZ) e *Rhizoctonia solani* (RS) confrontadas com a bactéria *Bacillus velezensis* LABIM40 em teste de cultura dupla.



Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: o próprio autor.

Resultados semelhantes foram obtidos por Ansary et al. (2018) em um ensaio de cultura dupla, no qual o crescimento de hifas de *Sclerotinia sclerotiorum* foi notavelmente inibido por colônias das cepas BDR-2 de *Bacillus amyloliquifaciens* e BRtL-2 e BCL-1 de *B. subtilis* em comparação com a placa controle. Ao observarem a formação de zonas de inibição claras ao redor das colônias bacterianas, os autores quantificaram a maior inibição do crescimento radial de *S. sclerotium* para a cepa BCL-1 (69,1%), seguida por BDR-2 (66,7%) e BRtL-2

(54,7%). Ainda, constataram que enquanto escleródios foram abundantes nas placas controle, nenhum escleródio foi produzido em placas com presença de *Bacillus* sp.

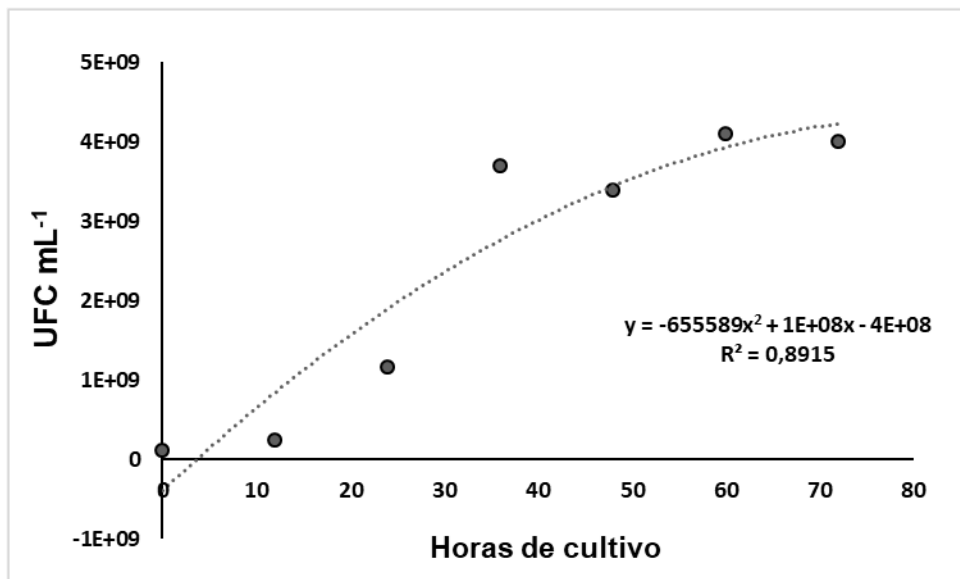
Lin et al. (2014) obtiveram resultados semelhantes em teste de cultura dupla realizado com 33 cepas de bactérias isoladas do resíduo de vinagre das quais 21 foram identificadas como pertencentes ao gênero *Bacillus*. As cepas CZB5, CZB15, CZB20 e CZB26 de *Bacillus* sp. apresentaram forte inibição, caracterizada pelos autores pela produção de zonas de inibição superiores a 5 mm, para os patógenos *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, *F. oxysporum* f. sp. *melonis*, *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, *F. oxysporum* f. sp. *niveum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium moniliforme*, *Glomerella cingulata* e *Rhizoctonia solani*.

A habilidade antifúngica de *Bacillus* sp. é ainda reiterada por diversos outros trabalhos. A cepa Z2-7 de *Bacillus cereus*, isolada da rizosfera de arroz (*Oryza sativa* L.) em cultivo no Paquistão, mostrou alta produção de sideróforos ($52,9 \mu\text{g L}^{-1}$) e capacidade de inibição ao fungo *R. solani* de 80% em teste de cultura dupla, mesmo quando em meios com ausência ou elevada concentração de ferro incorporado (NAUREEN et al., 2015). Cao et al. (2018), ao trabalharem com diversos isolados de bactérias, observaram inibições do crescimento micelial superiores a 50% para os fungos *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* e *Colletotrichum gloeosporioides* com as cepas Y6 e F7 de *B. velezensis* em teste de cultura dupla. Outro trabalho, realizado na Sérvia, apresenta resultados em ensaio de cultura dupla que corroboram a atividade testemunhada no presente trabalho, dado que o confronto dos dois melhores isolados de *Bacillus* sp. estudados contra os fungos fitopatogênicos *Macrophomina* sp., *Helminthosporium* sp. e *Fusarium* sp. resultaram em taxas de inibição de crescimento micelial de 27,06, 16,42 e 29,80% para o isolado Bac10 e 0, 25,86 e 32,55% para o isolado Bac6, respectivamente. Dessa forma, os autores constataram a antibiose pelos isolados de *Bacillus* utilizados e a especificidade de atuação entre cada cepa antagonista e seu principal microrganismo alvo (BJELIĆ et al., 2018).

Produção de fermentado livre de células da cepa LABIM40

O número de UFCs obtidas pela contagem de colônias em meio sólido ágar-MYP em função do tempo após o início da fermentação (0; 12; 24; 36; 48; 60 e 72 horas) apresentou melhor ajuste como equação polinomial de segundo grau, $y = -655589x^2 + (1 \cdot 10^8)x - (4 \cdot 10^8)$ (Figura 3). Através da equação obtida, os valores de UFC para os tempos analisados foram também estimados (Tabela 3). A fase de latência da cepa LABIM40 foi praticamente nula, como demonstrado pela curva obtida, possivelmente em razão do número de células presente no inóculo inicial oriundo de um cultivo de 24h. Através da obtenção do valor máximo da equação pela fórmula $-b/2a$, estimou-se que o número máximo de UFCs seria de $1,1 \times 10^{10}$ obtido às 76,26 horas de cultivo da bactéria.

Figura 3 – Curva de crescimento microbiano da cepa *Bacillus velezensis* LABIM40 durante 72 horas de cultivo.



Fonte: O próprio autor.

Em curvas de crescimento padrão identificam-se 4 fases de crescimento: fase lag (de latência ou de arranque), na qual as células adaptam o seu metabolismo ao novo meio de cultura e iniciam seu crescimento; fase exponencial, onde as bactérias se dividem a uma taxa máxima e constante; fase estacionária, correspondente à fase em que o crescimento populacional exponencial cessa e em que o número de células resultantes da multiplicação se iguala ao número de células que morre; e fase de declínio (ou de morte), na qual o número total de células

viáveis decresce e aumenta o de células que morrem, terminando por ocorrer lise celular. O crescimento microbiano é, no entanto, geralmente limitado por uma diversidade de condicionantes que resultam em ciclos de crescimento de duração total variável bem como de cada fase, variando de acordo com as condições ambientais e nutricionais do meio de cultivo bem como da espécie bacteriana em questão (MADIGAN et al., 2016).

Tabela 3 – Crescimento microbiano de *Bacillus velezensis* LABIM40 ao longo do tempo obtido e estimado segundo $y = -655589x^2 + (1 \cdot 10^8 x) - (4 \cdot 10^8)$.

Tempo (horas de cultivo)	UFC mL ⁻¹	
	Obtido	Estimado
0	1,2 x10 ⁸	4,0 x10 ⁸
12	2,4 x10 ⁸	8,9 x10 ⁸
24	1,2 x10 ⁹	2,4 x10 ⁹
36	3,7 x10 ⁹	4,1 x10 ⁹
48	3,4 x10 ⁹	5,9 x10 ⁹
60	4,1 x10 ⁹	7,9 x10 ⁹
72	4,0 x10 ⁹	10,2 x10 ⁹

Fonte: O próprio autor.

Cardozo e Araújo (2011), investigando a melhor composição de meio de cultura a partir de vinhaça, realizaram bioensaios com avaliação do crescimento de *B. subtilis* em meio líquido. O isolado de *B. subtilis* cultivado em meio de cultura contendo 25% do volume de vinhaça, denominado V25, apresentou o melhor desempenho para o crescimento microbiano ao longo de 7 dias de cultivo e obteve seu valor máximo entre o quinto (120 horas) e o sexto dia (144 horas). Os autores recomendaram este período para a produção da bactéria, no meio de cultura testado, com a finalidade de obtenção de maiores concentrações de células. Assim como neste trabalho, o modelo quadrático foi o que melhor se ajustou para representar a curva de crescimento bacteriano, com coeficiente de regressão significativo a 5% de probabilidade.

Sales, Takaki e Silva (2011) observaram o crescimento e a atividade antimicrobiana de *Bacillus licheniformis* UCP1016 ao longo de 96 horas de cultivo,

em meios identificados como alternativos, à base de soro de leite adicionados de glicose em diferentes concentrações, e controle padrão (meio de Hendlin para produção de bacitracina), a 150 rpm e temperaturas de 28 e 37 °C. Os resultados obtidos demonstraram que a fase de latência do microrganismo foi curta em ambos os meios testados, nas diferentes temperaturas e concentrações de glicose. A fase exponencial durou em média 48 horas para a temperatura mais baixa e 35 horas para a temperatura mais alta e a fase estacionária em média 30 horas às duas temperaturas. Além disso, o crescimento da cepa foi duas vezes maior para o cultivo à temperatura de 37 °C, a qual mostrou-se mais adequada para o microrganismo.

Em seu trabalho, Vasconcelos (2017) determinou as curvas de crescimento microbiano de 11 estirpes de *Bacillus cereus* em função da variação dos valores de pH e temperatura em caldo nutriente. A duração dos cultivos microbianos foi determinada em função do tempo necessário ao alcance da fase estacionária, variando entre 30 a 100 horas, de acordo com as condições de cultivo e a estirpe bacteriana. Apesar de cada estirpe ter apresentado um comportamento diferenciado com relação às variáveis analisadas, a autora observou que à medida que a temperatura e o pH foram aumentados, a taxa de multiplicação celular foi aumentada, chegando a 1×10^9 UFC mL⁻¹, e reduziu-se o tempo da fase lag. As maiores taxas de multiplicação celular ocorreram nas temperaturas de 32 °C e 37 °C e nos valores de pH entre 6,5 e 7. À temperatura de 25 °C e pH 7,0, o tempo médio de duração da fase lag para as 11 estirpes foi de 8,8 horas.

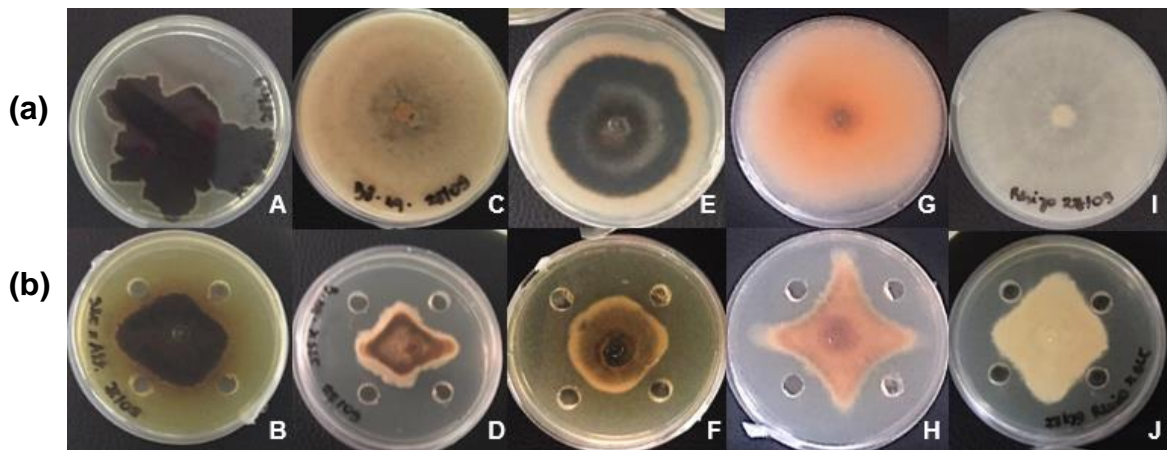
Dessa maneira, as condições de cultivo (tempo, temperatura e pH) empregadas no presente trabalho bem como a quantidade de UFCs mL⁻¹ atingida estão próximas ao que a autora obteve.

Teste de difusão em poço em meio solidificado

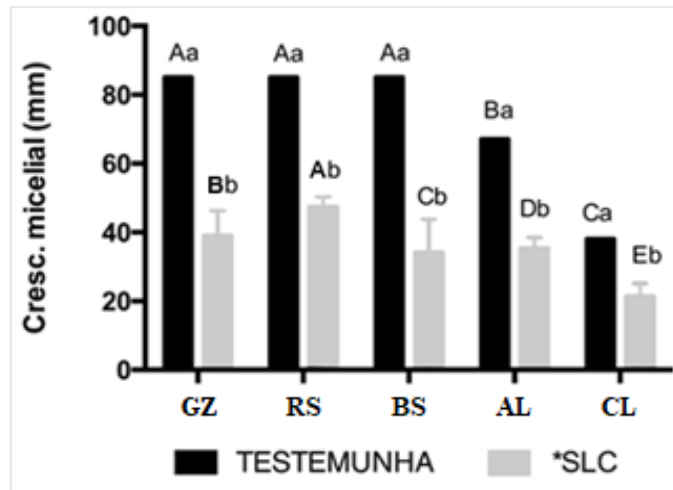
No teste de difusão em poço entre o SLC da cepa LABIM40 de *B. velezensis* e os isolados de *G. zaeae*, *R. solani*, *B. squamosa*, *A. linariae* e *C. lindemuthianum* (Figura 4a) foi constatada interação entre o crescimento micelial de todos os fungos nas placas controle e na presença de SLC difundido em poços bem como entre o crescimento de cada fungo (Figura 4b). A porcentagem de inibição do crescimento micelial (ICM %) para os fungos confrontados foi de 54,2; 44,4; 60,0;

47,4 e 43,9%, respectivamente (Figura 5). Os valores obtidos representam a média dos resultados dos 3 ensaios executados.

Figura 4 - Teste de difusão em poço entre o sobrenadante livre de células (SLC) da cepa LABIM40 de *Bacillus velezensis* e os fungos *Alternaria linariae* (AL), *Botryotinia squamosa* (BS), *Colletotrichum lindemuthianum* (CL), *Gibberella zeae* (GZ) e *Rhizoctonia solani* (RS) - (a) crescimento micelial dos fungos em cultura pura e (b) crescimento micelial dos fungos confrontados com o SLC da cepa LABIM40.

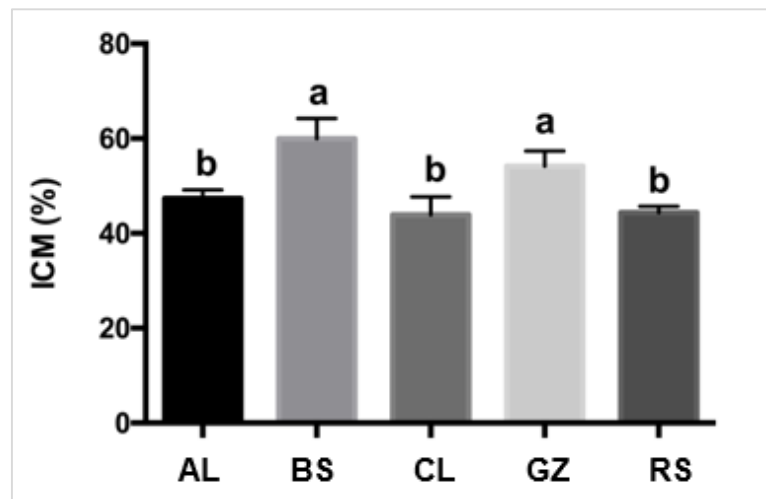


A) Placa controle de AL; B) SLC da cepa LABIM40 x AL; C) Placa controle de BS; D) SLC da cepa LABIM40 x BS; E) Placa controle de CL; F) SLC da cepa LABIM40 x CL; G) Placa controle de GZ; H) SLC da cepa LABIM40 x GZ; I) Placa controle de RS; J) SLC da cepa LABIM40 x RS.



Letras minúsculas iguais dentro de cada espécie e letras maiúsculas iguais entre espécies nas duas condições de cultivo (presença e ausência de SLC) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).
Fonte: O próprio autor.

Figura 5 - Porcentagem de inibição de crescimento micelial (ICM %) de colônias dos fungos *Alternaria linariae* (AL), *Botryotinia squamosa* (BS), *Colletotrichum lindemuthianum* (CL), *Gibberella zeae* (GZ) e *Rhizoctonia solani* (RS) confrontadas com o sobrenadante livre de células (SLC) de *Bacillus velezensis* LABIM40 em teste de difusão em poço.



Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).
Fonte: o próprio autor.

Liu et al. (2017), ao descreverem o genoma completo da espécie *Bacillus velezensis* LS69, verificaram seu poder de antagonismo contra várias bactérias fitopatogênicas Gram-negativas, tais como *Pectobacterium carotovorum* e *Erwinia amylovora*, e bactérias patogênicas humanas Gram-positivas, a exemplo de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Clostridium perfringens*. A habilidade antagonista foi evidenciada através da formação de halos de inibição superiores a 15 mm de diâmetro em teste de difusão em poço em placas contendo meio Luria-Bertani solidificado.

Em outro trabalho, ao utilizarem o método da difusão em poço em meio sólido, Srikhong et al. (2018) obtiveram resultado semelhante por meio da inibição do crescimento de *Colletotrichum capsici* em placas de BDA pelo sobrenadante livre de células da cepa M10 de *Bacillus* sp., o qual apresentou metabólitos antifúngicos de natureza proteica.

Fujita e Yokota (2019) verificaram inibição do crescimento de *F. oxysporum* f. sp. *lactucae*, agente causal da murcha-de-fusarium em alface, por meio da adição de iturina A e surfactina isolados da cepa ATCC21556 de *Bacillus subtilis* em meio de cultura líquido. Os autores constataram que baixas concentrações de

iturina A (inferiores a 50 mg L⁻¹) foram suficientes para inibir completamente o crescimento do fungo enquanto que nenhuma concentração de surfactina obteve inibição de crescimento micelial.

Através da mesma metodologia aqui empregada, a atividade antimicrobiana da fração extracelular lipopeptídica de *B. amyloliquefaciens* SR1 foi constatada por Jaivel et al. (2019) contra os fitopatógenos *R. solani*, *F. oxysporum*, *Sclerotium rolfsii*, *Alternaria solani*, *Macrophomina phaseolina* e *Aspergillus niger*. As médias das zonas de inibição para cada fungo, em centímetros, foram de 2,33, 1,90, 2,06, 2,23 1,80 e 2,30, respectivamente. Os autores justificaram a atividade antifúngica como sendo o resultado da secreção de surfactinas, principalmente, associadas à presença de iturinas e fengicinas no composto. Estes resultados corroboram os obtidos no presente trabalho, evidenciando a capacidade de inibição de fungos fitopatogênicos a partir de metabólitos, purificados ou não, de espécies de *Bacillus* sp.

Concentração inibitória mínima de crescimento micelial em meio sólido

Através dos dados obtidos das três repetições do experimento (Tabela 4) foi possível estimar a concentração inibitória mínima de SLC da cepa LABIM40 sobre o crescimento micelial de *B. squamosa*, *C. lindemuthianum*, *G. zeae* e *R. solani* através de análise de regressão.

O crescimento do fungo *A. linariae* não teve resposta às concentrações testadas e a regressão não foi significativa.

A inibição de crescimento micelial de *B. squamosa* aumentou significativamente até a concentração de 6,25 µg mL⁻¹, a qual obteve inibição de 62,72% equivalente às obtidas nas concentrações de 12,5, 25 e 50 µg mL⁻¹. A dose de 100 µg mL⁻¹ foi suficiente para inibir 100% da formação micelial do fungo. De acordo com o modelo $y=14,4622\ln(x) + 20,9559$ obtido através da regressão dos dados, o valor estimado da CIM para 100% de inibição seria de 236,41 µg mL⁻¹ (Figura 6A).

Tabela 4 – Porcentagem de inibição de crescimento micelial (ICM %) de colônias dos fungos *Alternaria linariae*, *Botryotinia squamosa*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Gibberella zeae* e *Rhizoctonia solani* em placas com concentrações crescentes de sobrenadante livre de células (SCL) de *Bacillus velezensis* LABIM40 incorporadas no meio de cultura batata-dextrose-ágar.

Concentração SCL ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	ICM %				
	<i>A. linariae</i>	<i>B. squamosa</i>	<i>C. lindemuthianum</i>	<i>G. zeae</i>	<i>R. solani</i>
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,78	-	3,65	-	-	42,89
1,562	-	24,42	-	-	50,26
3,125	-	48,61	-	-	55,68
6,25	18,28	62,72	1,69	14,75	56,46
12,5	13,81	62,72	14,58	17,70	62,40
25	13,43	62,54	36,27	19,56	66,15
50	7,84	61,40	40,34	19,75	71,58
100	9,70	100,00	51,53	31,47	73,51
200	13,81	100,00	66,10	42,25	84,11
400	19,03	100,00	69,15	49,95	100,00
500	21,64	-	70,17	56,37	-
600	20,15	-	71,53	60,29	-
Modelo		$Y = 14,4622\ln(x) + 20,9559$	$Y = 15,070\ln(x) - 19,577$	$Y = 10,2367\ln(x) - 10,8141$	$Y = 7,4422\ln(x) + 43,9101$
R²		0,8642	0,8985	0,7879	0,8751
F value	-	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Fonte: O próprio autor.

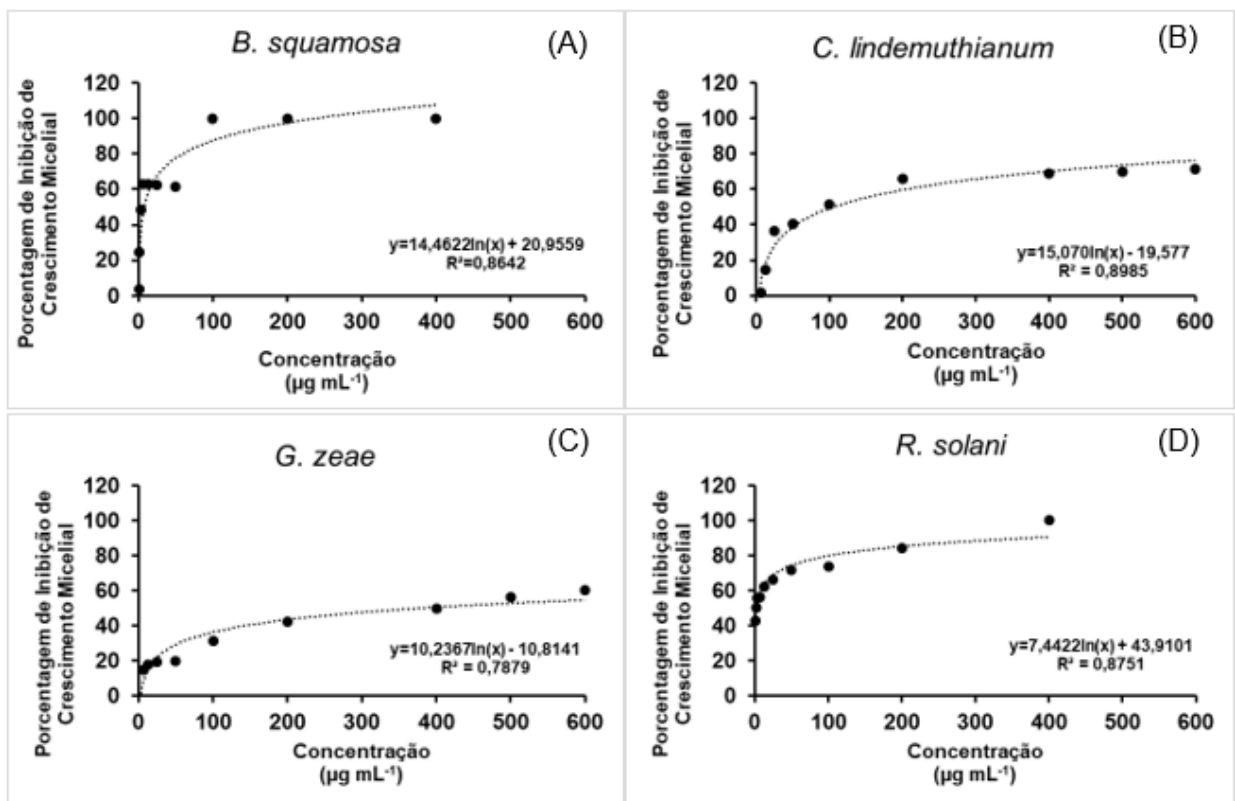
Para o fungo *C. lindemuthianum*, o aumento das doses de SLC determinou importante aumento da porcentagem de inibição do crescimento micelial até a concentração de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$, com menores acréscimos de inibição para concentrações acima deste valor. De acordo com o modelo $y=15,070\ln(x) - 19,577$ obtido através da regressão dos dados, o valor estimado da CIM para 100% de inibição seria de $2792,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 6B).

Para o fungo *G. zeae* o aumento das doses de SLC determinou aumento crescente da porcentagem de inibição do crescimento micelial. Através da equação $y=10,2367\ln(x) - 10,8141$ obtida por meio da regressão dos dados, o valor estimado da CIM para 100% de inibição será de $50270,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 6C).

Por último, o fungo *R. solani* foi o que respondeu mais expressivamente à menor concentração testada para todas as espécies, já

apresentando a inibição de crescimento de 50% do micélio em resposta à concentração de $1,562 \mu\text{g mL}^{-1}$. O aumento das doses de SLC determinou aumento crescente da inibição do crescimento micelial. À concentração de $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ o crescimento micelial foi totalmente inibido. Por meio do modelo $y=7,4422\ln(x) + 43,9101$ obtido através da regressão dos dados de *R. solani*, o valor da CIM estimada para 100% de inibição seria de $1875,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 6D).

Figura 6 – Concentração inibitória mínima, em $\mu\text{g mL}^{-1}$, de sobrenadante livre de células de *Bacillus velezensis* LABIM40 para o crescimento dos fungos *Botryotinia squamosa* (A), *Colletotrichum lindemuthianum* (B), *Gibberella zeae* (C) e *Rhizoctonia solani* (D).



Fonte: O próprio autor.

Trabalhando com linhagem de *B. amyloliquefaciens* LBM 5006 isolada de solo da Mata Atlântica, com capacidade de inibição dos fitopatógenos *Cercosporina sojina*, *F. oxysporum* e *Bipolaris sorokiniana*, Benitez (2010) avaliou a concentração inibitória mínima (CIM) de polipeptídeos do isolado frente a bactéria patogênica *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, causadora da listeriose em animais e humanos. A CIM foi determinada como 400 AU mL^{-1} (AU correspondente à

unidade arbitrária determinada pela autora), enquanto que uma dose de 3200 AU mL⁻¹ foi necessária para atingir um efeito bactericida.

Ao verificarem a antibiose exercida tanto pelo sobrenadante livre de células (SLC) da espécie *B. amyloliquefaciens* cepa BUZ-14 quanto por sua fração lipopeptídica frente aos fungos *B. cinerea*, *Monilinia fructicola*, *M. laxa*, *Penicillium digitatum*, *P. italicum* e *P. expansum*, Calvo et al. (2019) buscaram estudar os metabólitos secundários produzidos pela bactéria. Os autores determinaram que as principais famílias de metabólitos encontradas na fração lipopeptídica do SLC da bactéria foram iturina A, fengicina e surfactina, com concentrações máximas de 407, 853 e 658 µg mL⁻¹, respectivamente. Posteriormente, uma bioautografia por TLC revelou ser a iturina A o principal metabólito responsável pela inibição de crescimento micelial contra os fungos avaliados, estabelecendo-se as CIMs deste metabólito de 16,9 e 33,9 µg mL⁻¹ para espécies de *Monilinia* e *P. expansum* em frutos de pêssigo e maçã, respectivamente. Dada a grande similaridade genética entre as espécies *B. amyloliquefaciens* e *B. velezensis* e à mesma natureza dos metabólitos sintetizados, é possível supor que a utilização dos metabólitos purificados da cepa LABIM40 obtidos de seu SLC, reduziria drasticamente as concentrações necessárias para inibição do crescimento de micélio de fungos fitopatogênicos.

Germinação de sementes tratadas com produtos biológicos

Todos os tratamentos obtiveram resultados estatisticamente semelhantes entre si exceto pelo tratamento com sobrenadante livre de células concentrado dez vezes (SLCx10), que se mostrou fitotóxico nas condições testadas apresentando germinação e comprimento de caule e raiz significativamente inferiores aos outros (Tabela 5 e Figura 7).

Este resultado vai de acordo com o obtido por Shakir et al. (2015), que obtiveram redução na germinação de sementes de tomate pelo tratamento de sementes com agroquímicos (benzoato de emamectina, alfa-cipermetrina, lambda-cialotrina e imidaclopride) somente quando realizado em concentrações superiores às recomendadas.

Tabela 5 – Comprimento de radícula e hipocótilo de plântulas oriundas de sementes tratadas com água deionizada estéril (controle), suspensão de células da LABIM40, SLC, SLCx10 e PC_1 em papel filtro estéril umedecido em placas de Petri aos 7 dias após a semeadura.

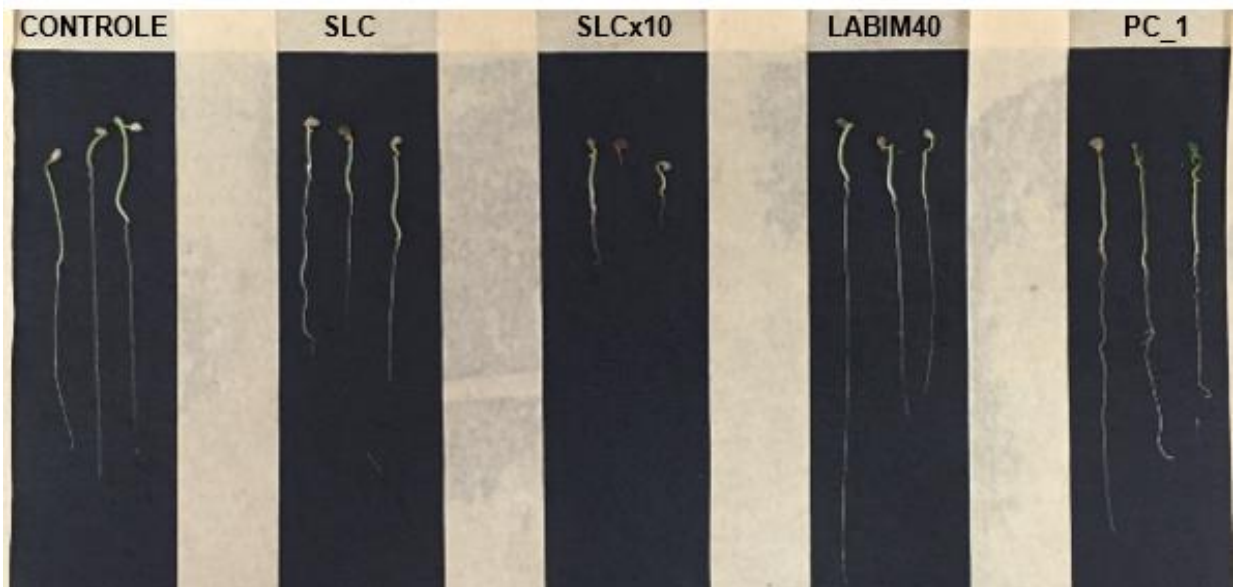
Comprimento (cm)	Tratamentos					C.V. (%)
	Controle	LABIM40	SLC	SLCx10	PC_1	
Radícula	4,75 a	4,72 a	4,58 a	0,92 b	4,5 a	52,98
Hipocótilo	2,28 a	2,18 a	2,05 a	0,96 b	2,34 a	42,68

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: O próprio autor.

A ausência de diferença estatística entre a germinação de sementes tratadas e não tratadas à base de *Bacillus* sp. também foi notada por Zohora, Ano e Rahman (2016). Em seu experimento, sementes de tomate tratadas com cultura de *Bacillus subtilis* cepa RB14, a uma concentração de células bacterianas de 10^8 UFC mL⁻¹, apresentaram 99% de índice de germinação, tal qual o obtido por sementes não tratadas.

Figura 7 – Comprimento de plântulas oriundas de sementes tratadas cultivadas em substrato de papel estéril em placas de Petri.



Fonte: O próprio autor.

Mathiba, Ntushelo e Mudau (2017) verificaram que o revestimento de sementes de quiabo (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench) com *B. subtilis* cepa BD233 (metodologia não descrita pelos autores) influenciou positivamente na

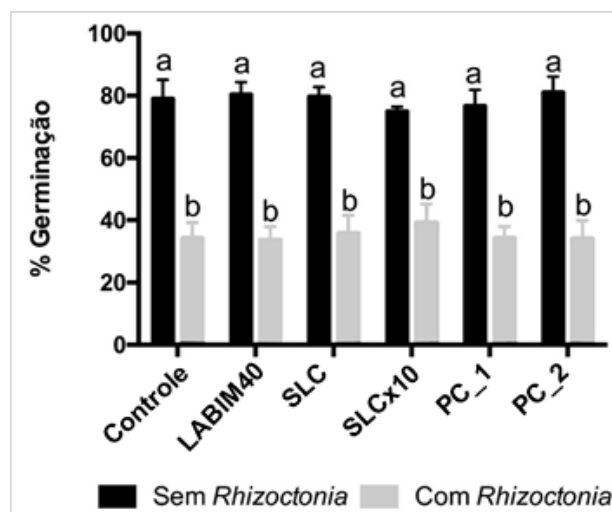
velocidade de germinação de sementes quando incubadas às temperaturas de 22 °C e 25 °C, aumentando em média 10% quando comparadas às sementes não tratadas. Na presença de cloreto de alumínio (AlCl_3) 0,01 M, o TS à base da bactéria obteve efeitos corretores e inibidores da toxicidade causada pelo sal.

No presente trabalho não se testou a influência da temperatura durante a germinação de sementes, parâmetro que pode ser utilizado em trabalhos futuros para verificar a capacidade da cepa LABIM40 influenciar a germinação de sementes a temperaturas mais altas.

Controle do tombamento em mudas de tomateiro

Os fatores (tratamentos de sementes x inoculado ou não com *R. solani*) não apresentaram interação. Obteve-se diferença estatística para a porcentagem de germinação apenas em relação à presença ou não do fungo, de 36,3 e 78,6%, respectivamente. Dessa maneira, em substrato estéril todos os tratamentos controle, LABIM40, SLC, SLCx10, PC_1 e PC_2 promoveram taxas de germinação estatisticamente iguais entre si, cujas médias foram de 79,0; 80,4; 79,7; 74,9; 76,7 e 81,0, respectivamente, superiores às obtidas na presença de *R. solani* inoculado no substrato, as quais foram de 38,9; 36,7; 34,5; 40,1; 32,8 e 35,0, respectivamente (Figura 8).

Figura 8 – Porcentagem de germinação de sementes tratadas de tomate em substrato estéril e inoculado com *Rhizoctonia solani*.



Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: O próprio autor.

Gowthan et al. (2018) obteve resultado de germinação de sementes de pimenta (*Capsicum annuum* L.) com o TS à base de isolado de *B. amyloliquefaciens* 8% superior ao controle aos 30 DAS, apresentando 84,75% de germinação total média.

Para o parâmetro porcentagem de sobrevivência aos 21 DAS, os fatores apresentaram interação entre si (Tabela 6). Os tratamentos controle, LABIM40 e SLC apresentaram porcentagens de sobrevivência estatisticamente iguais para as duas condições de cultivo. Quando em substrato estéril, estes foram estatisticamente superiores aos tratamentos SLCx10 e PC_1. Por sua vez, na presença de *R. solani*, todos os tratamentos (controle, LABIM40, SLC, SLCx10, PC_1 e PC_2) apresentaram taxas de sobrevivência significativamente inferiores às obtidas em substrato estéril, obtendo sobrevivência de 35,4, 26,0, 33,0, 60,2, 45,2 e 18,9%, respectivamente. Nesta condição de cultivo, o tratamento SLCx10 apresentou o melhor índice de sobrevivência, estatisticamente superior aos demais, que se distinguiram apenas do tratamento à base de *B. subtilis* (PC_2), estatisticamente inferior aos outros. Isso pode ter ocorrido devido à capacidade de difusão dos metabólitos secundários presentes no revestimento de sementes do tratamento SLCx10 junto ao substrato, o que explicaria a ausência de fitotoxicidade quando aplicado em condições *in vivo*. Somado a isso está o efeito das irrigações diárias, que podem ter “lavado” o excesso do tratamento das sementes, beneficiando sua germinação e sobrevivência.

Tabela 6 – Porcentagem de sobrevivência de plântulas aos 21 DAS oriundas de sementes tratadas com diferentes produtos em substrato inoculado e sem inocular com *Rhizoctonia solani*.

Substrato	Tratamentos						C.V. (%)
	Controle	LABIM40	SLC	SLCx10	PC_1	PC_2	
Sem <i>R. solani</i>	78,31 Aa	83,88 Aa	84,98 Aa	72,3 Ba	67,9 Ba	80,32 Aa	14,25
Com <i>R. solani</i>	27,71 Bb	21,8 Bb	28,05 Bb	43,52 Ab	30,71 Bb	15,16 Cb	36,96

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na coluna e letras maiúsculas iguais na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: O próprio autor.

A diferença entre a porcentagem de sementes germinadas e a porcentagem de sobrevivência aos 21 DAS demonstra a mortalidade ocorrida em

função do tombamento de plântulas ao longo do período de cultivo. Desse modo, apesar de os produtos de biocontrole não terem melhorado a germinação quando em presença do fungo, o tratamento SLCx10 apresentou sobrevivência 36% superior ao controle, o que mostra a efetividade do controle do patógeno por meio dos metabólitos secundários ali presentes.

A resposta inferior do tratamento à base de *B. subtilis* (PC_2) pode não ser condizente à realidade devido à diferente forma de aplicação do produto no ensaio, realizado no substrato, como recomendado pelos fabricantes, e não em tratamento de sementes. A escolha do produto com tal forma de aplicação para compor um dos tratamentos se deu pela ausência de produtos comerciais biológicos registrados para TS visando o controle de *R. solani*. Estudos futuros devem priorizar a padronização de um único tipo de aplicação, seja em TS ou em sulco, a fim de comparar com equidade a resposta de cada produto.

As cepas CZB5, CZB15, CZB20 e CZB26 de *Bacillus* sp., estudadas por Lin et al. (2014), apresentaram controle médio de 35% para a murcha de fusarium, causada por *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, e de 30% para o tombamento de mudas, causado por *R. solani*, em mudas de pepino, e mostraram ainda fortes atividades promotoras de crescimento de plantas por meio do incremento de massa seca radicular e de comprimento de parte aérea.

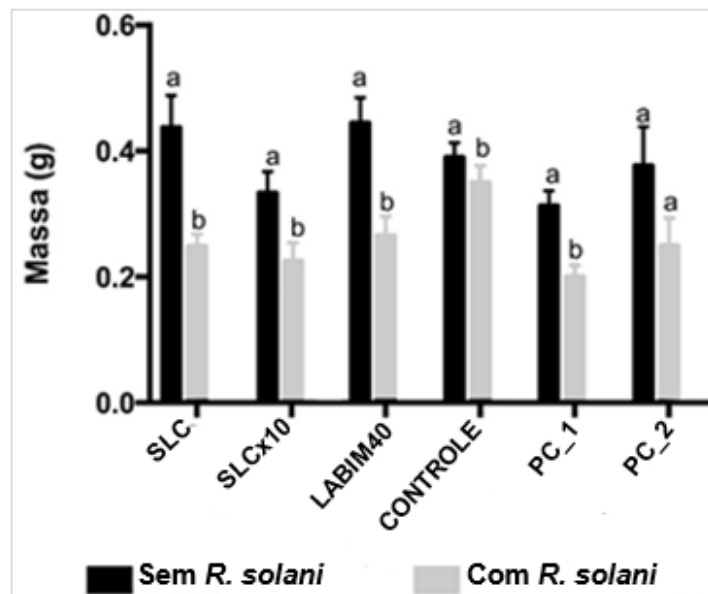
A cepa Z2-7 de *Bacillus cereus* mostrou capacidade de controlar o tombamento, causado por *R. solani*, em mudas de arroz, diminuindo a incidência da doença em 2,5 vezes quando comparada a plantas não tratadas, resultado equivalente ao obtido através de aplicação de fungicida comercial. Além disso, ao ser aplicada na rizosfera de plantas, a bactéria manteve-se com população colonizando raízes de maneira estável ao longo de 45 dias de cultivo, com $4,1 \times 10^8$ UFCs mL⁻¹ de solo (NAUREEN et al., 2015).

Efeito dos tratamentos sobre o desenvolvimento vegetativo de plantas de tomateiro

Não houve diferença estatística entre os fatores avaliados. Para a massa de plântulas, à exceção do tratamento composto pela aplicação de PC_2 nas células de semeadura, todos os tratamentos apresentaram diferença significativa entre os cultivos com e sem presença de *Rhizoctonia solani* (Figura 9).

Muis e Quimio (2006) obtiveram resultado similar, apresentando peso de plântulas oriundas de sementes de milho revestidas com suspensão de células de *B. subtilis* BR23, captan, metalaxyl e captan + metalaxyl estatisticamente iguais entre si quando a semeadura foi realizada em solo estéril.

Figura 9 – Massa, em gramas, de plântulas oriundas de sementes de tomate tratadas com sobrenadante livre de células (SLC) bruto da cepa LABIM40, SLC dez vezes concentrado (SLCx10), suspensão de células de *B. velezensis* LABIM40 (LABIM40), água deionizada estéril (controle), produto comercial 1 (PC_1) e de sementes cultivadas em células com aplicação de produto comercial 2 (PC_2) em cultivo em substrato sem e com *Rhizoctonia solani*.



Letras iguais dentro dos produtos não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: O próprio autor.

As médias dos tratamentos para o comprimento de caule e raízes foram 34,0 e 15,9% menores quando a semeadura foi realizada em substrato inoculado com *R. solani* se comparadas com os resultados obtidos na ausência do fungo. Além disso, a aplicação dos tratamentos não resultou em promoção de crescimento em ambas as condições de cultivo (Tabelas 7 e 8). Considerando todos os tratamentos, na ausência de *R. solani* o comprimento médio de caule e raiz foram de 9,2 e 5,5 cm. Por sua vez, em substrato inoculado com o fungo, os comprimentos médios para os parâmetros citados foram de 5,1 e 4,2 cm, respectivamente.

Tabela 7 – Comprimento, em centímetros, do caule de plântulas aos 21 DAS oriundas de semente tratadas com diferentes produtos em substrato inoculado e sem inocular com *Rhizoctonia solani*.

Substrato	Tratamentos						C.V. (%)
	Controle	LABIM40	SLC	SLCx10	PC_1	PC_2	
Sem <i>R. solani</i>	8,7a	8,6a	8,0a	8,2a	8,8a	9,0a	4,4
Com <i>R. solani</i>	5,8b	5,7b	5,0b	5,3b	6,0b	6,0b	7,2

Médias seguidas de letras minúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: O próprio autor.

Tabela 8 - Comprimento, em centímetros, da raiz de plântulas aos 21 DAS oriundas de semente tratadas com diferentes produtos em substrato inoculado e sem inocular com *Rhizoctonia solani*.

Substrato	Tratamentos						C.V. (%)
	Controle	LABIM40	SLC	SLCx10	PC_1	PC_2	
Sem <i>R. solani</i>	5,2a	5,8a	5,5a	5,7a	5,8a	6,2a	5,9
Com <i>R. solani</i>	4,5b	5,1b	5,0b	5,2b	3,8b	5,1b	11,3

Médias seguidas de letras minúsculas iguais, para comparação na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: O próprio autor.

Resultado diferente foi obtido em um trabalho realizado por Almaghrabi, Massoud e Abdelmoneim (2013), no qual foram estudados os efeitos dos isolados de *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus* sobre o crescimento de plantas de tomateiro e na reprodução de nematoides de galhas após 45 dias da infecção em plantas. O maior número de massa seca da parte aérea por planta foi de 43,00 g obtida pelo tratamento com *S. marcescens*, seguido de plantas com *P. putida* (34,33 g), *B. amyloliquefaciens* (31,66 g), *P. fluorescens* (30,0 g), *B. subtilis* (29,0 g), *B. cereus* (27,0 g) e o nematoide sozinho (não tratado) (20,0 g). O maior comprimento de plantas foi observado quando a planta foi tratada com *S. marcescens* (52,66 cm), seguidas de *P. fluorescens* (50,66 cm), *P. putida* (48 cm) e *B. amyloliquefaciens* (48 cm), respectivamente. Isso demonstra respostas superiores para massa e comprimento de plantas de tomateiro diante de tratamentos à base de espécies de bactérias diferentes, o que não foi obtido aqui.

Do mesmo modo, Sunar et al. (2015) relataram que a bactéria *Bacillus altitudinis* BRHS/S-73 possui características importantes de promoção de crescimento, testemunhadas pelas plantas avaliadas em seu experimento, aos 10 dias de crescimento. A inoculação de sementes de *Vigna radiata*, *Cicer arietinum* e *Glycine max* com a cepa aumentou o comprimento de parte aérea em 37,71, 33,21 e 44,76%, e o comprimento radicular em 35,12, 56,31 e 38,31% para as espécies citadas, respectivamente. Além disso, a inoculação com a bactéria também aumentou a biomassa de parte aérea em 62,50, 52,43 e 63,88% e radicular em 58,83, 60,00 e 68,42%, respectivamente. Não houve diferença significativa para os ganhos obtidos com a inoculação entre as espécies de leguminosas, evidenciando a habilidade da cepa de promover o crescimento em diferentes plantas.

Outros autores igualmente relataram efeito de promoção de crescimento através da aplicação de suspensões de células de *Bacillus* sp. e/ou de seus metabólitos em tratamento de sementes, diferentemente dos resultados aqui mostrados. Chen et al (2019), trabalhando com a inoculação do isolado *Bacillus velezensis* LD02 em sementes de amendoim, observaram aumento de 12,8, e 25,2% no comprimento de parte aérea e de raízes e incremento de 16,7 e 18,4% na massa seca de parte aérea e radicular, respectivamente, quando comparados com os resultados obtidos pelas testemunhas aos 14 dias de cultivo em vaso.

Gowthan et al. (2018) relataram que plantas de pimenta tratadas com uma cepa de *B. amyloliquefaciens* forneceram parâmetros de crescimento vegetativo máximo quando comparadas aos outros tratamentos, como altura da planta (18,32 cm), peso fresco da parte aérea (3,52 g), peso seco (1,53 g) e número de folhas (15,25 por planta).

3.6 CONCLUSÕES

Conclui-se que a bactéria *Bacillus velezensis* LABIM40 apresenta antagonismo contra os fungos fitopatogênicos *A. linariae*, *B. squamosa*, *C. lindemuthianum*, *G. zae* e *R. solani* verificado por testes de cultura dupla e difusão de sobrenadante livre de células (SLC) em meio sólido em condições *in vitro*. Em ensaio *in vivo*, quando em substrato inoculado com o *R. solani*, apenas o tratamento de sementes com SLCx10 foi superior ao controle, aumentando a sobrevivência de plantas cultivadas em 36%. Não foi constatada promoção de crescimento em plantas

de tomateiro, verificada pelo comprimento e massa de caule e raiz de plantas, para as condições deste experimento.

3.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através de teste de concentração inibitória mínima foi possível estimar as concentrações de SLC necessárias para a completa inibição do crescimento micelial de *A. linariae*, *B. squamosa*, *C. lindemuthianum*, *G. zae* e *R. solani*. O uso de SLC sem purificação dos metabólitos secundários tóxicos para os fungos explica as elevadas concentrações necessárias para conseguir a completa inibição do crescimento dos fungos testados.

Estudos com metabólitos secundários purificados com comprovada atividade antifúngica e outras formas, doses e frequências de aplicação devem ser conduzidos a fim de verificar a habilidade de controle biológico e promoção de crescimento da bactéria *Bacillus velezensis* LABIM40.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELJALIL, N. O.B. et al. Biocontrol of *Rhizoctonia* Root Rot in tomato and enhancement of plant growth using rhizobacteria naturally associated to tomato. **Journal of Plant Pathology & Microbiology**, v.7, n. 6, p. 1-8, 2016.
- ABDELNASSER, S. M. et al. Antitumor exopolysaccharides derived from novel marine *Bacillus*: isolation, characterization aspect and biological activity. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v.18, n.7, p.1847-1854, 2017.
- ADAPAR – Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Paraná. Disponível em: <<http://www.adapar.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=387>>. Acesso em: Jan 2019.
- ADHIKARI, P.; OH, Y.; PANTHEE, D. Current status of early blight resistance in tomato: An update. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 10, 2017.
- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5 ed. Burlington: Elsevier Academic Press, 2005.
- AGROFIT – **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: Jun 2018/Jan 2019.
- AJAYI-OYETUNDE, O. O.; BRADLEY, C. A. *Rhizoctonia solani*: taxonomy, population biology and management of *rhizoctonia* seedling disease of soybean. **Plant Pathology** v. 67, p. 3-17, 2017.
- ALMAGHRABI, O. A.; MASSOUD, S. I.; ABDELMONEIM, T. S. Influence of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on tomato plant growth and nematode reproduction under greenhouse conditions. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 20, n. 1, p. 57-61, 2013.
- ALVARENGA, M. A. R. **Tomate: produção em campo, em casa-de-vegetação e em hidroponia**. Lavras: UFLA, 2004. 400 p.
- ANSARY et al. Endophytic *Bacillus* spp. from medicinal plants inhibit mycelial growth of *Sclerotinia sclerotiorum* and promote plant growth. **Zeitschrift für Naturforschung: A journal of Biosciences**. 2018. 10p.
- ANVISA. **Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA)**: relatório das análises de amostras monitoradas no período de 2013 a 2015. Site da ANVISA, nov. 2016, 246 p.
- ARAÚJO, E. R.; ALVES, D. P.; HIGASHIKAWA, F. S. Cultivar resistance and chemical, biological and fertilizer treatments for controlling *Botrytis* leaf blight of onion. **Tropical Plant Pathology**, v. 43, n. 2, p. 160-164, 2017.

ARGUELLES-ARIAS, A. et al. *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. **Microbial Cell Factories**, v. 8, n.63, 2009.

AYALA, F. R. et al. Microbial flora, probiotics, *Bacillus subtilis* and the search for a long and healthy human longevity. **Microbial Cell**, v. 4, n. 4, p. 133–136, 2017.

BALBI-PEÑA, M. I. et al. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extratos de *Curcuma longa* e curcumina - II. Avaliação *in vivo*. **Fitopatologia Brasileira** v. 31, p. 401-404, 2006.

BAPTISTA, J. P. et al. Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* LABIM40, an effective antagonist of fungal plant pathogens. **Genome Announcements**, v. 6, n. 25, 2018.

BARBOSA, F.; GONZAGA, A. **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na Região Central Brasileira: 2012-2014**. Documentos, 272. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2012.

BARTHOLOMAUS, A. et al. Control of *Rhizoctonia solani* in sugar beet and effect of fungicide application and plant cultivar on inoculum potential in the soil. **Plant Disease**, v. 101, p. 941-947, 2017.

BENITEZ, L. et al. Antimicrobial activity of *Bacillus amyloliquefaciens* LBM 5006 is enhanced in the presence of *Escherichia coli*. **Current Microbiology**, v. 62, p. 1017–1022, 2010.

BETTIOL, W. Controle de doenças de plantas com agentes de controle biológico e outras tecnologias alternativas. In: CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. **Métodos alternativos de controle fitossanitário**. Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente, p. 191-216. 2003

BJELIĆ, D. et al. Antifungal and plant growth promoting activities of indigenous rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) rhizosphere. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 49, n. 1, p. 88-98, 2018.

BRITO, A. H. et al. Controle químico de doenças foliares e grãos ardidos em milho (*Zea mays* L.). *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v.11, n.1, p. 49-59, 2012.

BURKETT-CADENA, M. et al. Suppressiveness of root-knot nematodes mediated by rhizobacteria. **Biological Control**, v. 47, p. 55-59, 2008.

CALVO, A. et al. The role of iturin A from *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 in the inhibition of the most common postharvest fruit rots. **Food Microbiology**, 2019.

CAO, Y. et al. Antagonism of two plant-growth promoting *Bacillus velezensis* isolates against *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 4360, 2018.

CAPPELLARI, L. R. et al. Inducing phenolic production and volatile organic compounds emission by inoculating *Mentha piperita* with plant growth-promoting rhizobacteria. **Scientia Horticulturae**, v. 220, p. 193–198, 2017.

CARDOZO, R. B.; ARAÚJO, F. F. de. Multiplicação de *Bacillus subtilis* em vinhaça e viabilidade no controle da meloidoginose, em cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 15, n. 12, p. 1283–1288, 2011.

CARRISSE, O. et al. Management of *botrytis* leaf blight of onion: The Québec experience of 20 years of continual improvement. **Plant Disease**, v. 95, n. 5, p. 504-514, 2011.

CARVALHO, R. V.; PEREIRA, O. A. P.; CAMARGO, L. E. A. Doenças do Milho. **Manual de fitopatologia volume 2: Doenças de plantas cultivadas**. 5ª edição. Ouro Fino-MG: Ed. Ceres, 2016, p. 549-560.

CASA, R. T. et al. **Doenças do milho: guia de campo para identificação e controle**. Lages: Graphel, 2012. 82p.

CAWOY, H. et al. Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*. **Microbial Biotechnology**, v. 8, p. 281-295, 2015.

Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (CEPEA). **Custos de produção de tomate em Mogi Guaçu (SP)**. Junho de 2018. Disponível em: <<https://www.noticiasagricolas.com.br/noticias/hortifruti/216596-custos-de-producao-de-tomate-em-mogi-guacu-sp.html#.W22FwOhKjIU>>. Acesso em: 15 jul. 2018.

CHEN, X. H. et al. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. **Nature Biotechnology**, v. 25, p. 1007-1014, 2007.

CHEN, L. et al. Antimicrobial, plant growth-promoting and genomic properties of the peanut endophyte *Bacillus velezensis* LDO2. **Microbiological Research**, v. 2018. p. 41-48, 2019.

CHOWDHURY, S. P. et al. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 – a review. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 780, 2015.

CLAUS, D.; BERKELEY, R. C. W. Genus *Bacillus* Cohn 1872. In: **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, Sneath, P.H.A et al. (ed). The Williams and Wilkins Co., Baltimore, Md., v. 2, 1986.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically**; Approved Standard - Eighth Edition. Wayne, CLSI document M07-A8, 2009.

COHN, F. Untersuchungen über Bakterien. **Beitrage zur Biologie der Pflanzen Heft**, Berlin, v. 2, n. 1. p. 127-224, Jan. 1872.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1983. 539p.

COSTA, J. G. C. et al. Reação de variedades tradicionais de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*) coletadas no Estado do Paraná aos patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum*. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 43** - Embrapa Arroz e Feijão, p.1-15, 2015.

DAMASCENO SILVA, K. J.; SOUZA, E. A.; ISHIKAWA, F. H. Characterization of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from the State of Minas Gerais, Brazil. **Journal of Phytopathology**, v.155, n.4, p.241-247, 2007.

DARI, L.; ADDO, A.; DZISI, K. A. Pesticide use in the production of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in some areas of Northern Ghana. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 5, p. 352-355, 2016.

DELEU, M.; PAQUOT, M.; NYLANDER, T. Effect of fengycin, a lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*, on model biomembranes. **Biophysical Journal**, v. 94, p. 2667-2679, 2008.

DESJARDINS, A. E.; PROCTOR, R. H. Genetic diversity and trichothecene chemotypes of the *Fusarium graminearum* clade isolated from maize in Nepal and identification of a putative new lineage. **Fungal Biology**, v. 115, p. 38-48, 2011.

DORIGHELLO, D. V. **Controle da ferrugem asiática da soja (*Phakopsora pachyrhizi*) com óleo de café e *Bacillus* spp.** 45 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu, São Paulo. 2013.

DUTTA, S. et al. Genomic analyses reveal that biocontrol of wheat blast by *Bacillus* spp. may be linked with production of antimicrobial compounds and induced systemic resistance in host plants. **Figshare paper**. 2018. <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.5852661.v1>.

ETCHEVERRY, M. G., et al. Biological interactions to select biocontrol agents against toxigenic strains of *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* from maize. **Mycopathology**, v. 167, p. 287–295, v. 2009.

EUZÉBY, J. P. et al. **List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the internet**. Disponível em: <http://www.bacterio.net/bacillus.html>. Acesso em: 21 de Agosto de 2018.

FAOSTAT - **Food and agriculture organization of the united nations faostat**. 2019. Disponível em: [http:// faostat.fao.org />](http://faostat.fao.org/).

FEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DE GOIÁS (FAEG). **Custo de produção**, novembro 2016. Disponível em: <<http://sistemafaeg.com.br/mercados-e-cotacoes/custo-de-producao>> Acesso em: Ago 2017.

FUJITA, S.; YOKOTA, K. Disease suppression by the cyclic lipopeptides iturin A and surfactin from *Bacillus* spp. against *Fusarium* wilt of lettuce. **Journal of General Plant Pathology**, v. 85, n. 1, p. 44-48, 2019.

GAO, Z. et al. Identification of endophytic *Bacillus velezensis* ZSY-1 strain and antifungal activity of its volatile compounds against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*, **Biological Control**, v. 105, p. 27-39, 2017.

GOUDJAL, Y. et al. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off and promotion of tomato plant growth by endophytic actinomycetes isolated from native plants of Algerian Sahara. **Microbiological Research**, v. 169, n. 1, p. 59–65, 2014.

GOWTHAN, H. G. et al. Plant growth promoting rhizobacteria *Bacillus amyloliquefaciens* improves plant growth and induces resistance in chilli against anthracnose disease. **Biological Control**, v. 126, p. 209-217, 2018.

HAMZA, A., MOHAMED, A., DERBALAH, A. Unconventional alternatives for control of tomato root rot caused by *Rhizoctonia solani* under greenhouse conditions. **Journal of Plant Protection Research**, v. 56, p. 298-305, 2016.

HUANG, L. et al. *Bacillus velezensis* strain HYEB5-6 as a potential biocontrol agent against anthracnose on *Euonymus japonicas*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 27, n. 5, p. 636-653, 2017.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>> Acesso em: jan 2019.

IDRISS, E. E. et al. Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 20, p. 619-626, 2007.

INOUE-NAGATA, A. K. et al. Doenças do tomateiro. IN: AMORIM, L. et al. **Manual de fitopatologia volume 2: Doenças de plantas cultivadas**. 5ª edição. Ouro Fino-MG: Ed. Ceres, 2016, p. 697-732.

JAIVEL, N. et al. Antimicrobial activity and spectroscopic characterization of surfactin class of lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* SR1. **Microbial Pathogenesis**, v. 128, p. 374-380, 2019.

JIANG, C et al. *Bacillus velezensis*, a potential and efficient biocontrol agent in control of pepper gray mold caused by *Botrytis cinerea*. **Biological Control**, 2018.

JULIATTI, F.C. et al. Efeito do genótipo de milho e da aplicação foliar de fungicidas na incidência de grãos ardidos. **Bioscience Journal**. Uberlândia, v.23, n.2, p. 34-41, 2007.

KAHN, M.; MAYMON, M.; HIRSCH, A. M. Combating *Fusarium* infection using *Bacillus*-based antimicrobials. **Microorganisms**, v. 5, n. 4, p. 75, 2017.

KÄMPFER, P. et al. *Bacillus gossypii* sp. nov., isolated from the stem of *Gossypium hirsutum*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 65, n. 11, p. 4163-4168, Nov. 2015.

KAVROULAKIS, N. et al. Antagonistic bacteria of composted agro-industrial residues exhibit antibiosis against soil-borne fungal plant pathogens and protection of tomato plants from *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. **Plant Soil**, v. 333, p. 233–247, 2010.

KHALID, A., ARSHAD, M., ZAHIR, Z. A. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 473–480, 2004.

KUMAR, A. et al. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). **A promising approach for disease management**. p. 105-209, 2015.

LANNA-FILHO, R.; SOUZA, R. M.; ALVES, E. Induced resistance in tomato plants promoted by two endophytic bacilli against bacterial speck. **Tropical Plant Pathology**, p. 96-108, 2017.

LE COINTE, R. et al. Reducing the use of pesticides with site-specific application: the chemical control of *Rhizoctonia solani* as a case of study for the management of soil-borne diseases. **PLoS ONE**, v. 11, n. 9, 2016.

LEE, H. J. et al. Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* YJ11-1-4, a strain with broad-spectrum antimicrobial activity, isolated from traditional Korean fermented soybean paste. **Genome Announcements**, v. 5, n. 48, 2017.

LIM, S. M. et al. Diffusible and volatile antifungal compounds produced by an antagonistic *Bacillus velezensis* G341 against various phytopathogenic fungi. **Plant Pathology Journal**, v. 33, p. 488–498, 2017.

LIN, Y. et al. Potential biocontrol *Bacillus* sp. strains isolated by an improved method from vinegar waste compost exhibit antibiosis against fungal pathogens and promote growth of cucumbers. **Biological Control**, v. 71, p. 7-15, 2014.

LIU, B. et al. Biological control of take-all in wheat by endophytic *Bacillus subtilis* E1R-j and potential mode of action. **Biological Control**, San Diego, v. 49, n. 3, p. 277-285, Jun. 2009.

LIU, K. et al. Induction of systemic resistance in Chinese cabbage against black rot by plant growth-promoting rhizobacteria. **Biological Control**, v. 99, p. 8–13, 2016.

LIU, K. et al. Selection and assessment of plant growth-promoting rhizobacteria for biological control of multiple plant diseases. **Phytopathology**, v. 107, p. 928-936, 2017.

LIU, Z. et al. The highly modified microcin peptide plantazolicin is associated with nematicidal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 10081–10090, 2013.

LOPES, C. A.; AVILA, A. C. **Doenças do tomateiro**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2 ed, 2005. 151 p.

LOURENÇO JR, V. et al. Molecular diversity and evolutionary processes of *Alternaria solani* in Brazil inferred using genealogical and coalescent approaches. **Phytopathology**, v. 99, p. 765-774, 2009.

OLIVEIRA, A. C. C. et al. Metodologias de inoculação de *Rhizoctonia solani* na cultura da cenoura. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 992-995, maio/jun., 2008

MA, J. et al. Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* GQJK49, a plant growth-promoting rhizobacterium with antifungal activity. **Genome Announcements**, v. 5, n. 35, 2017.

MADIGAN, M. et al. **Microbiologia de Brock**, 14^o ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. 960 p.

MANJUNATH, B. et al. Integrated management of anthracnose of field bean caused by *Colletotrichum lindemuthianum*. **Environment and Ecology**, Bethesda, v. 34, n. 3, p. 1013-1017, Mar. 2016.

MAPA - <http://www.agricultura.gov.br/noticias/cresce-numero-de-registros-de-produtos-biologicos-para-uso-agricola>. Cresce número de registros de produtos biológicos para uso agrícola. Publicado em 09 jan 2019.

MARTINEZ-RAUDALES, I. et al. Draft genome sequence of *Bacillus velezensis* 2A-2B strain: a rhizospheric inhabitant of *Sporobolus airoides* (Torr.) Torr., with antifungal activity against root rot causing phytopathogens. **Stand Genomic Sciences**, v. 12, n. 73. 2017.

MASSAWE et al. Volatile Compounds of endophytic *Bacillus* spp. have biocontrol activity against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, 2018.

MASSOLA JR, N. S. et al. Doenças do alho e da cebola. **Manual de fitopatologia volume 2: Doenças de plantas cultivadas**. 5^a edição. Ouro Fino-MG: Ed. Ceres, 2016, p. 63-75.

MATHIBA, M; NTUSHELO, K; MUDAU, F. Influence of temperature, aluminium chloride toxicity and exposure to *Bacillus subtilis* on the germination of okra. **South African Journal of Plant and Soil**, v. 34, n. 3, p. 231-234, 2017.

MENEZES, M. 2006. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, v. 3, p.170-179, 2006.

MENG, Q.; JIANG, H.; HAO, J. Effects of *Bacillus velezensis* strain BAC03 in promoting plant growth. **Biological Control**, v. 98, p. 18-26, 2016.

MIA, M. A. B. et al. Rhizobacteria as bioenhancer and biofertilizer for growth and yield of banana (*Musa* spp. cv. 'Berangan'). **Scientia Horticulturae**, v.126, p. 80–87, 2010.

MONTEALEGRE, J. R. et al. Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato. **Electron Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 115–127, 2003.

MUIS, A.; QUIMIO, A. J. Biological control of banded leaf and sheath blight disease (*Rhizoctonia solani* Kuhn) in corn with formulated *Bacillus subtilis* BR23. **Indonesian Journal of Agricultural Science**, v. 7, n.1, p. 1-7, 2006.

MYCOBANK. Mycobank Database. **Fungal Databases, Nomenclature & Species Banks**. Disponível em: <<http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx>>.

NAIKA, S. et al. **A cultura do tomate: Produção, processamento e comercialização**. Wageningen: Fundação Agromisa e CTA. Agrodok, v.17, 104p., 2006.

NAUREEN, Z. et al. Suppression of incidence of *Rhizoctonia solani* in rice by siderophore producing rhizobacterial strains based on competition for iron. **European Scientific Journal**, v. 11, n. 3, p. 186-207, 2015.

NAYAKA, S.C. et al. Control of *Fusarium verticillioides*, cause of ear rot of maize, by *Pseudomonas fluorescens*. **Pest Management Science**, London, v. 65, p. 769–775, 2009.

NAWROCKA, J. et al. Involvement of metabolic components, volatile compounds, PR proteins, and mechanical strengthening in multilayer protection of cucumber plants against *Rhizoctonia solani* activated by *Trichoderma atroviride* TRS25. **Protoplasma**, v. 255, p. 255-359, 2018.

NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**. Approved Standard—Eighth. NCCLS document M2-A8, Pennsylvania, USA: Edition Wayne, 2003.

NIE, P. et al. Induced systemic resistance against *Botrytis cinerea* by *Bacillus cereus* AR156 through a JA/ET- and NPR1-Dependent signaling pathway and activates PAMP-Triggered immunity in Arabidopsis. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. 238, 2017.

OGOSHI, A. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 25, p. 125-143, 1987.

PARIKH, L.; ESKELSON, M. J.; ADESEMOYE, A. O. Relationship of *in vitro* and *in planta* screening: improving the selection process for biological control agents against *Fusarium* root rot in row crops. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 51, n. 3-4, p. 156-169, 2018.

PATIL, H. J. et al. Selective isolation, evaluation and characterization of antagonistic actinomycetes against *Rhizoctonia solani*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 2163–2170, 2010.

PAULA JÚNIOR, T. J.; VENZON, M. **101 culturas: Manual de tecnologias agrícolas**. Belo Horizonte: EPAMIG. 800p. 2007.

PAVAN, M. A. et al. Doenças das Solanáceas. IN: AMORIM, L. et al. **Manual de fitopatologia volume 2: Doenças de plantas cultivadas**. 5ª edição. Ouro Fino-MG: Ed. Ceres, 2016, p. 697-732.

PAZ, I. et al. Biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Calonectria gracilis* by eucalypts growth promoters *Bacillus* spp. **Microbial Pathogenesis**, v. 121, p. 106-109, 2018.

PERALTA, I. E.; SPOONER, D. M. History, origin and early cultivation of tomato (*Solanaceae*). In: RAZDAN, M.K.; MATTOO, A. K. (EDS.). **Genetic improvement of solanaceous crops vol. 2**. Enfield, Nueva Hampshire: Science Publishers, 2007. V. 2, p. 1-27.

PEREIRA, P. et al. Effects of maize inoculation with *Fusarium verticillioides* and with two bacterial biocontrol agents on seedlings growth and antioxidative enzymatic activities. **Applied Soil Ecology**, v. 51, p. 52–59, 2011.

PEREIRA, R. B.; CARVALHO, A. D. F.; PINHEIRO, J. B. Manejo da pinta preta: uma ameaça às lavouras de tomateiro a céu aberto. **Comunicado 95**, p. 1-5, 2013.

PERFUMO, A.; BANAT, I. M.; MARCHANT, R. **Going green and cold: Biosurfactants from low-temperature environments to biotechnology applications. Trends in Biotechnology**. p. 1-13, 2018.

PHI, Q.-T. et al. Assessment of root-associated *Paenibacillus polymyxa* groups on growth promotion and induced systemic resistance in pepper. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 1605–1613, 2010.

PODILE, A. R.; KISHORE, G. K. Plant growth-promoting rhizobacteria. In: GNANAMANICKAM, S. S. (Ed.). **Plant associated bacteria**. Netherlands: Springer, 2006. p. 195-230.

RAASCH, L. D.; BONALDO, S. M.; OLIVEIRA, A. A. F. *Bacillus subtilis*: enraizamento e crescimento de miniestacas de eucalipto em Sinop, norte de Mato Grosso, Brasil. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 29, n. 1, p. 1446-1457, 2013.

RAJENDRAPRASAD, M. et al. Biological control of tomato damping off caused by *Rhizoctonia solani*. **International Journal of Chemical Studies**, v. 5, n. 4, p. 1426-1432, 2017.

REID, L. M., HAMILTON, R. I.; MATHER, D. E. Screening maize for resistance to *Gibberella* ear rot. Technical Bull 1996- 5E, Research Branch, **Agriculture and Agri-Food Canada**, 1996.

REIS, E. M.; CASA, R. T.; BIANCHINI, V. Controle de doenças de plantas pela rotação de culturas. **Summa Phytopathologica**, v. 37, n. 3, p. 85-91, 2011.

RIBEIRO, V. P. et al. Endophytic *Bacillus* strains enhance pearl millet growth and nutrient uptake under low-P. **Environmental Microbiology**, v. 425, p. 1-7, 2018.

RITCHIE, K. B. et al. Survey of antibiotic-producing bacteria associated with the epidermal mucus layers of rays and skates. **Frontiers in Microbiology**, p. 1-11, 2017.

RODRIGUES, T. T. M. S. et al. First report of *Alternaria tomatophila* and *A. grandis* causing early blight on tomato and potato in Brazil. **New Disease Reports**, v. 22, n. 28, 2010.

RODRIGUES, T. T. M. S.; MIZUBUTI, E. S. G. Pinta preta: surge uma nova espécie. **Revista Batata Show**, Itapetininga, v. 24, p. 14-16, 2009.

ROMEIRO, R. S. **Controle biológico de doenças de plantas: fundamentos**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2007.

SAGGESE, A. et al. A Marine isolate of *Bacillus pumilus* secretes a pumilacidin active against *Staphylococcus aureus*. **Marine Drugs**, v. 16, p. 1-13, 2018.

SALES, A.; TAKAKI, G.; SILVA, C. Avaliação da produção de bacitracina em diferentes temperaturas por *Bacillus licheniformis* (UCP 1016), utilizando meios alternativos contendo soro de leite. **Exacta**, v. 9, n. 2, p. 231-240, 2011.

SAYYED, R. Z.; REDDY, M. S.; AL-TURKI, A. Recent trends in PGPR research for sustainable crop productivity. **Scientific Publishers** (India), 2016. 258 p.

SCHIRAWSKI, J.; PERLIN, M. H. Plant–Microbe interaction 2017—The good, the bad and the diverse. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 5, p. 1374, 2018.

SEN, A., BATRA, A. Evaluation of antimicrobial activity of different solvent extracts of medicinal plant: *Melia azedarach* L. **International Journal of Current Pharmaceutical Research**, v. 4, p. 67-73, 2012.

SHAKIR, S. et al. Effect of some commonly used pesticides on seed germination, biomass production and photosynthetic pigments in tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Ecotoxicology**, v. 25, n. 2, p. 329-341, 2015.

SNEH, B.; BURPEE, L.; OGOSHI, A. **Identification of *Rhizoctonia solani* species**. St Paul: APS Press, 1991. 134 p.

SON, J.-S. et al. Induced systemic resistance against gray leaf spot in pepper by *Enterobacter* species isolated from family *Gramineae* plants in Dokdo. **Korean Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 40, 135–143, 2012.

SON, J.-S. et al. Screening of plant growth-promoting rhizobacteria as elicitor of systemic resistance against gray leaf spot disease in pepper. **Applied Soil Ecology**, v.73, p. 1– 8, 2014.

SRIKHONG, P. et al. *Bacillus* sp. strain M10 as a potential biocontrol agent protecting chili pepper and tomato fruits from anthracnose disease caused by *Colletotrichum capsici*. **BioControl**, v. 63, n. 6, p. 833-842, 2018.

SUMIDA, C. H.; BALBI-PEÑA, M. I. Tombo alto. **Revista Cultivar Hortaliças e Frutas**, Pelotas-RS, v. 80, jun-jul 2013. Disponível em: <<https://www.grupocultivar.com.br/acervo/160>>. Acesso em: Junho 2018.

SUNAR, K. et al. Biocontrol efficacy and plant growth promoting activity of *Bacillus altitudinis* isolated from Darjeeling hills, India. **Journal of Basic Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 91-104, 2015.

SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: Bailey JA, Jeger MJ (eds), **Colletotrichum: Biology, Pathology and Control**. C.A.B.I., Wallingford, pp. 1–26, 1992.

SZILAGYI-ZECCHIN, V. J. **Uso da bactéria promotora do crescimento vegetal, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42, no tomateiro em cultivo orgânico**. 2016. 95 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO) / NEPA – UNICAMP. Campinas: NEPA-UNICAMP, 4 ed., 2011. 161 p.

TRIVEDI, P.; PANDEY, A. Plant growth promotion abilities and formulation of *Bacillus megaterium* strain B 388 (MTCC6521) isolated from a temperate Himalayan location. **Indian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 342-347, 2009.

TROTEL-AZIZ, P. et al. *Bacillus subtilis* PTA-271 counteracts *Botryosphaeria* dieback in grapevine, triggering immune responses and detoxification of fungal phytotoxins. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1-14, 2019.

VASCONCELOS, A. C. M. **Modelagem determinística do crescimento de *Bacillus cereus* em função do pH e temperatura**. 50f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 2017.

VERDESOTO, Andrea Michelle Campaña. **Identificación microbiológica y molecular mediante pcr en tiempo real de dos bacterias del género *Bacillus*, de interés agrobiotecnológico**. 2018. 76p. Dissertação (Ingeniería en biotecnología de los recursos naturales) - Universidad Politécnica Salesiana, Quito-Ecuador.

WANG, X. et al. *Bacillus cereus* ar156 induced resistance to *Colletotrichum acutatum* is associated with priming of defense responses in loquat fruit. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. 3-10, 2014.

- WANI, P. A.; KHAN, M. S.; ZAIDI, A. *Bacillus* species enhance growth parameters of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in chromium stressed soils. **Food Chemical Toxicology**, v. 48, p. 3262–3267, 2010.
- WENDLAND, A. et al. Doenças do feijoeiro. In: Amorim, L. et al. **Manual de Fitopatologia**, v.2, ed.5, p.383-396. Editora Ceres, 2016.
- WOUDENBERG, J. H. et al. Large-spored *Alternaria* pathogens in section *Porri* disentangled. **Studies in mycology**, v. 79, p. 1-47, 2014.
- WU, L. M. et al. Difficidin and bacilysin from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 have antibacterial activity against *Xanthomonas oryzae* rice pathogens. **Scientific Reports**, 2015.
- XIANG, N.; LAWRENCE, K. S.; DONALD, P. A. Biological control potential of plant growth-promoting rhizobacteria suppression of *Meloidogyne incognita* on cotton and *Heterodera glycines* on soybean: A review. **Journal of Phytopathology**, p. 449-458. v. 166, 2018.
- XU, T., ZHU, T., LI, S. Beta-1,3-1,4-glucanase gene from *Bacillus velezensis* ZJ20 exerts antifungal effect on plant pathogenic fungi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 26, 2016.
- YADAV, A. N. et al. Bioprospecting of plant growth promoting psychrotrophic *Bacilli* from cold desert of north western Indian Himalayas. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 52, n. 2, p. 142-150, 2016.
- YU, G. Y. et al. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 34, p. 955-963, 2002.
- ZACHOW, C.; GROSCH, R.; BERG, G. Impact of biotic and abiotic parameters on structure and function of microbial communities living on sclerotia of the soil-borne pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. **Applied Soil Ecology**, v. 48, n. 2, p. 193–200, 2011.
- ZAIDI, A. et al. Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. **Acta Microbiologia et Immunologica Hungarica**, v. 56, p. 263–284, 2009.
- ZAMBOLIM, Laércio. - **PROTEÇÃO DE PLANTAS: Manejo Integrado de Doenças de Plantas**. Viçosa, 2010.
- ZOHORA, U. S., ANO, T., RAHMAN, M. S. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* K1 by Iturin A producer *Bacillus subtilis* RB14 seed treatment in tomato plants. **Advances in Microbiology**, v. 6, p. 424-431, 2016.