

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

AMANDA DO PRADO MATTOS

Bacillus amyloliquefaciens cepa PKM16 no controle do mofo branco do
tomateiro

Maringá
2020

AMANDA DO PRADO MATTOS

Bacillus amyloliquefaciens cepa PKM16 no controle do mofo branco do
tomateiro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de concentração: Proteção de Plantas.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Katia Regina Freitas Schwan Estrada
Coorientador: Prof^ª. Dr^ª. Adriana Terumi Itako

Maringá

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

M444b Mattos, Amanda do Prado
Bacillus amyloliquefaciens cepa PKM16 no controle do mofo branco do tomateiro / Amanda do Prado Mattos. -- Maringá, 2020.
xi, 65 f.: il. color., figs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Katia Regina Freitas Schwan-Estrada.

Coorientadora: Profa. Dra. Adriana Terumi Itako.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2020.

1. Controle biológico - Mofo branco - Tomateiro.
2. Rizobactérias. 3. *Sclerotinia sclerotiorum*. 4. *Bacillus amyloliquefaciens*. I. Schwan-Estrada, Katia Regina Freitas, orient. II. Itako, Adriana Terumi, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Agronomia. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDD 21.ed. 632.4

Elaine Cristina Soares Lira - CRB-9/1202

FOLHA DE APROVAÇÃO

AMANDA DO PRADO MATTOS

Bacillus amyloliquefaciens cepa PKM16 no controle do mofo branco do
tomateiro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia do Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agronomia pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof^ª. Dr^ª. Edilaine Mauricia Gelinski Grabicoski
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Prof^ª. Dr^ª. Adriana Terumi Itako
(Coorientadora)
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC/Curitiba

Prof^ª. Dr^ª. Katia Regina Freitas Schwan-Estrada
(Orientadora)
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Aprovada em: 27/02/2020

Local de defesa: Sala de Videoconferência, Bloco J45, Universidade Estadual de Maringá,
Maringá-PR

DEDICATÓRIA

*À minha família, pela
fortaleza, compreensão, incentivo e
todo o empenho e esforços a mim
dedicados.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, por iluminar e guiar minhas escolhas e pelas pessoas que colocou em meu caminho.

À minha família, pela inspiração, fortaleza e por sempre confiar e acreditar em meu potencial, me encorajando a ser cada dia melhor.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Kátia Regina Freitas Schwan Estrada, juntamente com minha coorientadora Prof^a Dr^a Adriana Terumi Itako, pessoas por quem sempre tive grande admiração e amizade. Agradeço imensamente pela orientação, paciência e confiança.

Aos professores João Batista Tolentino Jr., Cesar Marchioro e Crysttian Arantes Paixão, pelo apoio e amizade.

Aos meus amigos e colegas Bruna Broti Rissato, Lorrant Cavanha Gabriel, Priscila Angelotti, Paulo Castanho, Angélica Miamoto, Vitor Vargas Schwan e Marcos Renan Besen agradeço por tudo que me ensinaram, pela paciência e disposição, por todo o apoio, em especial nos momentos mais difíceis e principalmente por me receberem com muito carinho.

Agradeço imensamente aos demais integrantes da equipe de laboratório, que não mediram esforços em me ajudar, fazendo parte desta conquista.

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

À Universidade Estadual de Maringá, pela oportunidade e todo suporte durante o mestrado.

Meu sincero agradecimento a todos que participaram dessa etapa, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho. Gratidão.

RESUMO

MATTOS, Amanda do Prado. Universidade Estadual de Maringá, fevereiro de 2020. ***Bacillus amyloliquefaciens* cepa PKM16 no controle do mofo branco do tomateiro.** Orientadora: Kátia Regina Freitas Schwan Estrada. Coorientadora: Adriana Terumi Itako.

O tomateiro possui importância socioeconômica e nutricional, estando entre as principais hortaliças do mercado brasileiro. Esta cultura pode ser acometida por doenças como o mofo branco, causada pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, que é extremamente agressivo e de difícil controle. O objetivo deste trabalho foi verificar o potencial antimicrobiano de bactéria isolada da rizosfera de tomateiro sobre *S. sclerotiorum*, bem como, na indução de resistência em plantas de tomate cultivar Micro-Tom. Um teste prévio foi realizado com três rizobactérias isoladas da rizosfera do tomateiro, para a determinação do melhor agente antagonista. A partir disso, foi realizado o sequenciamento para identificação do antagonista, sendo encontrado como *B. amyloliquefaciens* cepa PKM16. Para a utilização do antagonista foi determinada a concentração do caldo bacteriano em mix e mix autoclavado *in vitro* e *in vivo*, nas doses de 0, 20, 30 e 40% em meio BDA, com adição do patógeno e incubação. Após determinada a melhor concentração de *B. amyloliquefaciens*, foi avaliado o efeito residual na indução de resistência em plantas de tomate cultivar Micro-Tom contra o fitopatógeno, onde os tratamentos foram mix 20%, mix autoclavado 20%, produto comercial a base de *B. subtilis* (controle positivo) e água destilada autoclavada (controle negativo). Os mesmos tratamentos foram utilizados no teste de inibição de germinação miceliogênica de escleródios *in vitro*, bem como na indução da atividade das enzimas relacionadas à patogênese: peroxidase, catalase, polifenoloxidase, fenilalanina amônia-liase e β -1,3-glucanase. A concentração mínima de mix e mix autoclavado de *B. amyloliquefaciens* que melhor inibiu o crescimento micelial e desenvolvimento do fungo foi de 20%, com efeito residual, nas condições testadas, de 4 dias para mix e 2 dias para mix autoclavado. O tratamento mix influenciou na germinação de escleródios com inibição de quase 30%. Os tratamentos a base de *B. amyloliquefaciens* influenciaram na atividade das enzimas. Os resultados obtidos mostraram que a rizobactéria *B. amyloliquefaciens* cepa PKM16 possui caráter antagonista, sendo eficiente na inibição de crescimento micelial de *S. sclerotiorum* e viabilidade de escleródios, além de atuar, juntamente com o patógeno, como agente indutor na ativação da atividade das enzimas peroxidase de guaiacol, catalase, fenil alanina amônia-liase, polifenoloxidase e β -1,3-glucanase.

Palavras-chave: Controle biológico, mecanismos de defesa, Micro-Tom, PR-proteínas, rizobactérias, *Sclerotinia sclerotiorum*

ABSTRACT

MATTOS, Amanda do Prado. Universidade Estadual de Maringá, fevereiro de 2020. *Bacillus amyloliquefaciens* strain PKM16 in the control of tomato white mold. Advisor: Kátia Regina Freitas Schwan Estrada. Co-advisor: Adriana Terumi Itako.

The tomato has a socioeconomic and nutritional importance, being among the main vegetables in the Brazilian market. This crop can be affected by diseases such as white mold, caused by the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*, which is extremely aggressive and difficult to control. The aim of this work was to verify the antimicrobial potential of the bacteria isolated from the rhizosphere of tomato on *S. sclerotiorum* and on the resistance induction in the tomato plants cultivar Micro-Tom. A previous test was carried out with three rhizobacteria isolated from the rhizosphere of the tomato, to determine the best antagonist agent. From that, the sequencing was performed to identify the antagonist, being found as *B. amyloliquefaciens* strain PKM16. For the use of the antagonist, the concentration of the bacterial broth in mix and autoclaved mix was determined in vitro and in vivo, at the doses of 0, 20, 30 and 40% in BDA culture medium, with the addition of the pathogen and then the incubation. After determining the best concentration of *B. amyloliquefaciens*, the residual effect on the resistance induction in tomato plants cultivar Micro-Tom against phytopathogen was evaluated, where the treatments were 20% mix, 20% autoclaved mix, commercial product based on *B. subtilis* (positive control) and autoclaved distilled water (negative control). The same treatments were used to test the myceliogenic germination of sclerotia in vitro, as well as to induce the activity of enzymes related to pathogenesis: peroxidase, catalase, polyphenoloxidase, phenylalanine ammonia lyase and β -1,3-glucanase. The minimum mix concentration and autoclaved mix of *B. amyloliquefaciens* that best inhibited the mycelial growth and fungus development was 20%, with a residual effect, under the conditions tested, of 4 days for mix and 2 days for autoclaved mix. The mix treatment influenced the germination of sclerotia with almost 30% inhibition. The treatments based on *B. amyloliquefaciens* influenced the activity of the enzymes. The results showed that the rhizobacterium *B. amyloliquefaciens* strain PKM16 has an antagonistic effect, being efficient in inhibiting the mycelial growth of *S. sclerotiorum* and the viability of the sclerotia, in addition, acting as an inducing agent in the activation of the activity of guaiacol peroxidase, catalase, phenyl alanine ammonia lyase, polyphenoloxidase and β -1,3-glucanase.

Keywords: Biological control, defense mechanisms, Micro-Tome, PR-proteins, rhizobacteria, *Sclerotinia sclerotiorum*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - *Solanum lycopersicum* cv Micro-Tom em fase de formação e amadurecimento de frutos. Fonte: a autora **6**
- Figura 2 – Ciclo de vida do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*. Fonte: Adaptado de Wharton e Kirk 2007..... **8**
- Figura 3 – (a) Placa de Petri com o fungo *Sclerotinia sclerotiorum* e escleródios formados; (b) escleródio germinado formando apotécio. Fonte: a autora. **9**
- Figura 4 – Esquema do fenômeno de resistência sistêmica induzida (ISR), ocasionada pelo agente de biocontrole *Bacillus amyloliquefaciens*. Fonte: Adaptado de Lanna Filho et al., 2010..... **12**
- Figura 5 - Halo de inibição gerado por um dos isolados de rizobactéria (RB1) aos demais microrganismos presentes em placa de Petri com meio AN, após 7 dias de incubação. Fonte: a autora..... **19**
- Figura 7 - (a) Erlenmeyers contendo meio de cultura BDA+mix autoclavado de PKM16 e meio de cultura autoclavado fundente pronto para receber mix de PKM16; (b) Placa de Petri com meio de cultura + tratamento solidificado e disco de micélio de *Sclerotinia sclerotiorum*. Fonte: a autora **22**
- Figura 8 – (a) Mudanças de tomate Micro-Tom antes do transplante; (b) Transplante de mudas de tomate Micro-Tom 22 dias após a semeadura. Fonte: a autora **23**
- Figura 9 – (a) Estádio fenológico de 5 folhas verdadeiras de plantas de tomate Micro-Tom e (b) aplicação dos tratamentos com aspersor manual. Fonte: a autora **23**
- Figura 10 – (a) Placa com o fungo *Sclerotinia sclerotiorum* e ponteiras; (b) Inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum* pelo método da ponteira; (c) Incubação das plantas após inoculação. Fonte: a autora **24**
- Figura 11 – (a) Sintoma de *Sclerotinia sclerotiorum* na haste principal da planta de tomateiro Micro-Tom no início da infecção; (b) Micélio branco cotonoso crescendo sobre a haste e lesão pardo escura encharcada. Fonte: a autora..... **25**
- Figura 12 - Tratamentos água destilada autoclavada (T), produto comercial a base de *Bacillus subtilis* (PC), mix autoclavado 20% de PKM16 (A) e mix 20% de PKM16 (M). Fonte: a autora..... **26**
- Figura 13 – (a) Preparo de mix e mix autoclavado de PKM16 em ambiente estéril; (b) Erlenmeyers com meio de cultura e solução bacteriana; (c) Agitação de Erlenmeyers em mesa agitadora 180 rpm, 28±2°C. Fonte: a autora..... **26**
- Figura 14 - (a) Placa com *Sclerotinia sclerotiorum* de 20 dias de incubação e escleródios; (b) escleródios desinfestados prontos para serem tratados; (c) Placa de Petri com meio BDA+azul de bromofenol e escleródios tratados. Fonte: a autora..... **28**
- Figura 15 – (a) Coleta da folha da unidade amostral para análise enzimática; (b) Folha pronta para ser armazenada em papel alumínio e gelo. Fonte: a autora **29**
- Figura 16 - Obtenção do extrato enzimático: (a) Folhas maceradas em almofariz; (b) Microtubos contendo o extrato enzimático bruto após maceração e microtubos com extrato

enzimático após centrifugação; (c) Microtubos com o sobrenadante do extrato sendo armazenados. Fonte: a autora	29
Figura 17 - Preparo das concentrações para a determinação da curva padrão de proteínas. Fonte: a autora	30
Figura 18 - Crescimento do fitopatógeno <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (cm) na presença de três isolados de rizobactérias. Letras iguais não diferem entre si de acordo com o teste de SkottKnott ($p < 0,05$) CV: 10,65; (b) Halo de inibição permanente do isolado.	36
Figura 20 - Área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) do fungo <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em plantas de tomate cv. Micro-Tom (<i>in vivo</i>) submetidos às concentrações de 0, 20, 30, 40 e 50% de mix autoclavado (A) e mix (M) de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> cepa PKM16. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de ScottKnott ($p < 0,05$).CV (%) 22,51.	41
Figura 21 - Inibição de germinação de escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> submetidos aos tratamentos (a) água destilada autoclavada, (b) mix autoclavado de PKM16 20%, (c) Produto comercial a base de <i>Bacillus subtilis</i> e (d) mix de PKM16 20%	44
Figura 22 - Atividade da enzima Peroxidase de guaiacol – POD (Δ ABS.min ⁻¹ .mg proteína ⁻¹) em plantas de tomate Micro-Tom as 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas após a aplicação dos tratamentos (AAT) mix 20% e mix autoclavado 20% de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> PKM16, produto comercial e água destilada autoclavada; e com inoculação de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em 48h AAT. Barras referem-se ao desvio padrão da média.	46
Figura 23 - Atividade da enzima Catalase – CAT (μ mol. min ⁻¹ .mg proteína ⁻¹) em plantas de tomate Micro-Tom as 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas após a aplicação dos tratamentos (AAT) mix 20% e mix autoclavado 20% de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> PKM16, produto comercial e água destilada autoclavada; e com inoculação de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em 48h AAT. Barras referem-se ao desvio padrão da média.	47
Figura 24 - Atividade da enzima Fenilalanina amônia-liase – PAL (mg ác trans.mg proteína ⁻¹) em plantas de tomate Micro-Tom as 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas após a aplicação dos tratamentos (AAT) mix 20% e mix autoclavado 20% de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> PKM16, produto comercial e água destilada autoclavada; e com inoculação de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em 48h AAT. Barras referem-se ao desvio padrão da média.	49
Figura 25 - Atividade da enzima Polifenoloxidase – PPO (Δ ABS.min ⁻¹ .mg proteína ⁻¹) em plantas de tomate Micro-Tom as 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas após a aplicação dos tratamentos (AAT) mix 20% e mix autoclavado 20% de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> PKM16, produto comercial e água destilada autoclavada; e com inoculação de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em 48h AAT. Barras referem-se ao desvio padrão da média.	51
Figura 26 - Atividade da enzima β -1,3 glucanase – GLU (μ g glicose.mg proteína ⁻¹) em plantas de tomate Micro-Tom as 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas após a aplicação dos tratamentos (AAT) mix 20% e mix autoclavado 20% de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> PKM16, produto comercial e água destilada autoclavada; e com inoculação de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em 48h AAT. Barras referem-se ao desvio padrão da média.	52

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Área abaixo da curva do crescimento micelial (AACCM) do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* em meio BDA submetidos a três isolados de rizobactérias nos testes de confronto direto e compostos voláteis. 35
- Tabela 2 – Área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) causada por *Sclerotinia sclerotiorum*, inoculados em diferentes dias em plantas de tomate cv. Micro-Tom, submetidos a tratamento prévio mix e mix autoclavado de *Bacillus amyloliquefaciens* PKM16 em concentração de 20%, água e produto comercial a base de *Bacillus subtilis*..... 42

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1	Cultura do tomateiro	4
2.1.1	Aspectos gerais.....	4
2.1.2	Relevância socioeconômica e nutricional.....	5
2.1.3	Cultivar Micro-Tom e a sua utilização na pesquisa	6
2.2	Doenças do tomateiro	7
2.2.1	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	7
2.3	Controle biológico de doenças de plantas.....	10
2.4	Indução de resistência.....	11
2.4.1	Proteínas relacionadas à patogênese (PRPs).....	13
2.3.1.1	Peroxidase (POD), (E.C 1.11.1.7)	14
2.3.1.2	Catalase (CAT), (E.C. 1.11.1.6)	14
2.3.1.3	Polifenoloxidase (PPO),(E C 1.10.3.2)	15
2.3.1.4	Fenilalanina amônia liase (PAL), (EC 4.3.1.5)	15
2.3.1.5	β -1,3-glucanases (GLU), (EC 3.2.1.6).....	16
2.5	Rizobactérias promotoras de crescimento como agentes indutores de resistência	16
2.4.1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	17
3	MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1	Obtenção e manutenção dos isolados das bactérias com potencial antagonista	19
3.2	Issolado de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	19
3.3	Confronto direto e compostos voláteis	20
3.4	Sequenciamento e manutenção do isolado	21
3.5	Determinação da concentração do mix e do mix autoclavado	21
3.6	Efeito residual dos tratamentos	25
3.7	Avaliação da germinação miceliogênica de escleródios	27
3.8	Avaliação de enzimas relacionadas à patogênese	28
3.8.1	Aplicação dos tratamentos e coleta	28
3.8.2	Obtenção do extrato enzimático	29
3.8.3	Análises bioquímicas	30
3.7.3.1	Proteínas totais.....	30
3.7.3.2	Atividade de peroxidase de guaiacol (POD) (E C 1.11.1.7)	30
3.7.3.3	Atividade de catalase (CAT) (E C 1.11.1.6)	31

3.7.3.4 Atividade de polifenoloxidase (PPO) (E C 1.10.3.2).....	32
3.7.3.5 Atividade de β -1,3 glucanase (GLU) (E C 3.2.1.6)	32
3.7.3.6 Fenilalanina amônia liase (PAL) (EC 4.3.1.5)	33
3.8.4 Análise estatísticados dados.....	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 Confronto direto e compostos voláteis	35
4.2 Determinação da concentração do mix e do mix autoclavado	38
4.3 Efeito residual	42
4.4 Germinação miceliogênica de escleródios.....	43
4.5 Ativação de enzimas relacionadas à patogênese	45
4.5.1 Atividade de Peroxidase de guaiacol (POD)	45
4.5.2 Atividade de Catalase (CAT)	46
4.5.3 Atividade de Fenil alanina amônia-liase (PAL).....	49
4.5.4 Atividade dePolifenoloxidase (PPO).....	50
4.5.5 Atividade de β -1,3 glucanase (GLU).....	51
5 CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS.....	55

1 INTRODUÇÃO

A produção de hortaliças tem grande importância social e econômica. Esta atividade produz alimento, gera emprego e renda, além de fortalecer a agricultura familiar (CARVALHO et al., 2014). O tomateiro (*Solanumlycopersicum*) é a segunda solanácea mais cultivada no Brasil, com produção nacional de 4.075.890 toneladas e uma área plantada de 58.166 hectares, com destaque para a região sudeste (IBGE, 2020). A grande demanda do mercado de produtos *in natura*, juntamente com a indústria, torna o tomate uma das mais importantes hortaliças produzidas (ALVARENGA, 2013). Ademais, o tomateiro é um excelente modelo para o estudo de processos biológicos, mas seu tamanho e ciclo de vida dificultam sua contínua utilização. Como alternativa para utilização na pesquisa, Meissner (1997) propôs a cultivar miniatura Micro-Tom, que produz frutos e sementes viáveis em 70-90 dias, em vasos de 50-150 mL (TANKSLEY, 1993; MEISSNER et al., 1997).

O tomateiro é acometido por doenças durante todo o ciclo da cultura e isto compromete a produção (ALVARENGA, 2013). Uma das doenças que atinge a cultura, principalmente o tomate industrial, é o mofo branco, incitado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary. Este é um patógeno que causa sérios problemas nas áreas infestadas, principalmente quando há o adensamento acentuado de plantas, longos períodos de precipitação, elevada umidade do ar e temperaturas amenas (15 °C a 21 °C). As regiões serranas do país, bem como as regiões do cerrado irrigadas com pivô central são as que apresentam incidência mais expressiva da doença (JONES et 1991; REIS et al., 2007).

O fungo ataca todos os órgãos da planta, apresentando maior severidade no caule, com lesões pardo-escuras úmidas e micélio branco cotonoso, com o anelamento total e murcha da parte aérea. Pode haver a formação de escleródios, estruturas de resistência formadas por um emaranhado de hifas e com a capacidade de sobreviver em condições não favoráveis durante muitos anos (AMORIM et al, 2016; JACCOUD FILHO et al., 2017).

Os métodos de controle desta doença baseiam-se na prevenção, evitando a entrada do patógeno. A rotação de cultura é limitada, pois este patógeno é polífago, acometendo 75 famílias de plantas e mais de 400 espécies (BOLAND e HALL, 1994; LEITE, 2005). Além disso, não há híbridos de tomateiro resistentes a esta doença disponíveis no mercado. O controle químico nem sempre é eficiente devido à dificuldade de atingir o solo, local onde se concentram as estruturas de resistência. A partir disso pode ocorrer maior infestação no solo para as próximas safras, além de perdas na produção (REIS et al., 2007). O manejo integrado

torna-se a solução para o controle desta doença, abrangendo o controle químico, o cultural, o biológico e a indução de resistência (JACCOUD FILHO et al., 2017).

Neste contexto, as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs) ou Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR), têm sido estudadas há vários anos devido à sua capacidade de promover o crescimento de plantas. São bactérias da rizosfera com habilidade de colonizar as raízes das plantas na presença da microbiota natural do solo. Entre as RPCPs, destacam-se as dos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus* e actinobactérias do gênero *Streptomyces* (BROWN, 1974; HAYAT et al., 2010). Nos últimos anos, foi crescente o número de pesquisas voltadas à utilização de RPCPs como biocontroladoras de fitopatógenos, de modo que inúmeros trabalhos comprovaram o potencial destas como agentes controladores de doenças e como indutores de resistência em plantas (QIAO et al., 2014; LI et al., 2015; KANG et al., 2015; SINGH et al., 2016).

A indução de resistência é caracterizada pelo incremento da capacidade de defesa das plantas contra patógenos, obtida a partir da ativação de seus mecanismos de defesa já existentes, porém latentes, quando submetidas a agentes bióticos ou abióticos (PASCHOLATI e DALIO, 2018). Tais mecanismos tornam a planta mais resistente aos patógenos, a partir do atraso da entrada e/ou o desfavorecimento do seu desenvolvimento na planta induzida (STANGARLIN et al, 2011; SONG et al., 2015).

Este fenômeno tem se mostrado promissor como uma alternativa no manejo integrado de doenças em plantas. A integração de diferentes métodos de controle, bem como a utilização desta nova tecnologia possibilita maior eficiência no manejo de doenças, além de reduzir os níveis de contaminação do ambiente pelo uso exclusivo de agroquímicos, que, muitas vezes, não é eficiente como medida única de controle. Além disso, o mercado de produtos orgânicos e a procura por segurança alimentar vêm crescendo e, conseqüentemente, a demanda por produtos livres de agroquímicos (TOLEDO et al., 2011).

Sendo assim, o controle de fitopatógenos com o uso de rizobactérias promotoras do crescimento que possam ativar mecanismos de defesa da planta, pode ser uma alternativa para o manejo de patógenos de solo considerados de difícil controle. Neste sentido, o objetivo geral do trabalho foi avaliar o potencial antagonista de um isolado de rizobactéria sobre *S. sclerotiorum* seu potencial em induzir resistência em plantas. Para tanto, os objetivos específicos foram: i) Testar o efeito de três isolados de rizobactérias no crescimento micelial *in vitro* de *S. sclerotiorum*; ii) Determinar a melhor concentração do caldo bacteriano do melhor isolado, no controle *in vivo* e *in vitro* deste patógeno; iii) Avaliar o efeito residual da

melhor concentração do caldo do melhor isolado na indução de resistência no tomateiro; iv) Verificar o potencial do isolado na inibição da germinação miceliogênica de escleródios; v) Averiguar o potencial do isolado como indutor da atividade de enzimas relacionadas à patogênese.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Cultura do tomateiro

2.1.1 Aspectos gerais

O tomateiro tem como nome científico *Solanum lycopersicum*, dado por Linnaeus em 1753, alterado por botânicos no decorrer da história, mas novamente firmado. É pertencente à família das solanáceas (Solanaceae), onde também estão inclusas espécies como a batata, o pimentão, a berinjela e o tabaco. A espécie foi domesticada no México, mas o seu centro de origem compreende a região dos Andes, a qual abrange parte dos países do Equador, Colômbia, Peru, Bolívia e Chile. A cultura do tomate foi expandida para todos os lugares do mundo a partir do comércio marítimo de espanhóis e portugueses, chegando ao Brasil no século XIX. O consumo do fruto sempre foi considerável, mas foi após a Primeira Guerra Mundial que realmente se expandiu (NAIKA et al., 2006; BECKER et al., 2016).

A espécie adapta-se bem em diferentes latitudes e temperaturas, sendo cultivada em todas as regiões do Brasil. O fotoperíodo ótimo é de 15 horas de luz, enquanto a temperatura ótima é estádio dependente, variando de 18 a 25°C, desde a germinação até a maturação dos frutos. Temperaturas abaixo de 10 °C e acima de 38°C podem causar danos aos tecidos da planta. A união destes fatores, juntamente com a nutrição adequada, boa disponibilidade de água e concentração de CO₂ propiciam um ótimo desenvolvimento da cultura (ALMEIDA, 2006).

O tomateiro possui porte arbustivo, podendo ter crescimento determinado ou indeterminado dependendo da variedade, o que define a condução da cultura. A produção destinada à frutos para consumo *in natura*, são em sua maioria de hábito indeterminado, onde caracteriza-se a colheita prolongada e práticas como o tutoramento e podas. Já os tomateiros de hábito determinado, são geralmente demandados na indústria, sendo conhecidos também por tomate de cultivo rasteiro (ALVARENGA, 2013).

As folhas desta espécie são compostas de folíolos e são alternadas. O sistema radicular é pivotante, com raízes secundárias e adventícias, se concentrando nos primeiros 20cm do solo, mas podendo atingir profundidades maiores de 1 metro. As flores são bissexuais e desenvolvem-se geralmente entre as folhas, mas também de forma oposta. A autopolinização está presente na maioria dos casos, dando origem a frutos do tipo baga, de aspecto carnoso e

suculento, bi, tri ou plurilocular. Estes produzem de 50 a 200 sementes pequenas, cobertas por tricomas e de formato reniforme (NICK et al., 2018).

2.1.2 Relevância socioeconômica e nutricional

Os principais países produtores de tomate são China, Índia, Turquia e Estados Unidos. O Brasil ocupa a 10ª posição em produção de tomate no mundo (FAO, 2017), com produção nacional, para mesa e indústria, de 4.075.890 toneladas e uma área plantada de 58.166 hectares, logo, produção média atual de aproximadamente 70 t.ha⁻¹. A região sudeste é a maior produtora, com 1.739.908 toneladas em uma área de 23.349 hectares. As mesoregiões de Itapetininga (SP), Ribeirão Preto (SP), Triângulo Mineiro (MG) e Central Espírito-santense (ES) totalizam quase 50% da produção da região. Em nível de estado, Goiás é o maior produtor, com produção de 1.357.790 toneladas (IBGE, 2020). Na região Sul a produtividade ultrapassa 500 mil toneladas com área plantada de quase 9 mil hectares.

Esta hortaliça é cultivada no mundo inteiro e é comercializada *in natura* ou nas formas de suco, molho, desidratada, pasta. A produção de hortaliças tem grande importância social e econômica, produzindo alimento, gerando emprego e renda e vivificando a agricultura familiar. Em especial, a cultura do tomateiro é conhecida por demandar de grande número de mão de obra, principalmente durante a colheita, apresentando grande relevância social e influência no desenvolvimento regional (CARVALHO et al., 2014).

Além da relevância socioeconômica, pode-se destacar a importância nutricional. Tomates são amplamente consumidos e podem fornecer uma proporção significativa de antioxidantes na dieta. É considerado um alimento funcional devido aos altos teores de vitaminas A, C e licopeno. Além disso, os frutos são compostos de água, açúcar, ácidos como o acético, láctico e o málico, potássio, fósforo e ferro. Apresentam baixa quantidade de gordura e baixo teor calórico (MONTEIRO et al., 2008). A concentração de nutrientes do tomate depende da variedade, condições de solo, manejo adotado pelo produtor e condições climáticas do local de cultivo. Contudo, entre os carotenóides presentes, o licopeno predomina e é o principal responsável pela cor vermelha dos frutos de tomate e seus derivados (MARTINEZ-VALVERDE et al., 2002).

O licopeno é um hidrocarboneto polinsaturado que está presente no tomate com concentrações variando de 0,9 a 4,2 mg/ 100 g. É um potente antioxidante com maior eficiência de inibição de radicais livres e pode modular mutagênese e carcinogênese, ou seja,

é considerado um poderoso anticancerígeno (GUPTA et al., 2013). Trabalhos demonstram que a ação antioxidante também está relacionada com a concentração de compostos fenólicos como a quercetina, que é o principal flavonóide presente no tomate (MONTEIRO et al., 2008).

2.1.3 Cultivar Micro-Tom e a sua utilização na pesquisa

Além de toda a importância socioeconômica e nutricional, o tomateiro é um excelente modelo para o estudo de processos biológicos. Porém, seu tamanho e ciclo de vida dificultam sua constante utilização. A partir disso, a cultivar Micro-Tom, que produz frutos e sementes viáveis em 70-90 dias, torna-se uma ótima alternativa para sua utilização na pesquisa (TANKSLEY, 1993; MEISSNER et al., 1997).

A cultivar miniatura, Micro-Tom (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom) foi proposta por Meissner et al. (1997) como um modelo genético, que produz frutos e sementes viáveis e podem ser cultivados em vasos de 50 a 150 mL de substrato, completando seu ciclo de vida entre 70 a 90 dias. Atualmente o Micro-Tom (MT) tem sido proposto como cultivar preferencial para pesquisas a nível molecular em tomateiro (MARTÍ et al., 2006) (Figura 1).

Entre muitas variedades de tomate, o Micro-Tom foi reconhecido como um cultivar modelo para pesquisa porque compartilham algumas vantagens importantes com *Arabidopsis*, incluindo seu pequeno tamanho, ciclo de vida curto e a capacidade de crescer sob lâmpadas fluorescentes em alta densidade (SHIKATA e EZURA, 2016).



Figura 1 - *Solanum lycopersicum* cv Micro-Tom em fase de formação e amadurecimento de frutos. Fonte: a autora

2.2 Doenças do tomateiro

A ocorrência de uma doença é função da interação de três fatores fundamentais: hospedeiro suscetível, patógeno virulento e ambiente favorável (REZENDE, et al., 2011). As solanáceas, em especial o tomateiro, são acometidas por uma série de doenças, as quais causam danos e perdas de produtividade quando não manejadas corretamente. As doenças que ocorrem na cultura do tomateiro constituem uma das principais causas de sua baixa produtividade no Brasil (ALVARENGA, 2013).

A cultura é suscetível a inúmeras espécies de patógenos, incluindo fungos, vírus, bactérias e nematoides. As principais doenças que ocorrem no tomateiro, causadas por vírus são o mosaico dourado e vira-cabeça, que pode ser causada por diversas espécies de vírus como o Tomato severe rugose vírus e Tomato spotted wilt vírus. Em relação aos nematóides, destaca-se o nematóide das galhas (*Meloidogyne* spp.), e bactérias como a *Clavibacter michiganensi* subsp. *michiganensi* causando o cancro bacteriano e *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* causando a mancha bacteriana. Já em relação aos fungos destaca-se a doença requeima (*Phytophthora infestans*), pinta-preta (*Alternaria solani*) e o mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) principalmente em tomateiro rasteiro (INOUE-NAGATA et al., 2016).

2.2.1 *Sclerotinia sclerotiorum*

As solanáceas, em especial o tomateiro, são acometidas por uma série de doenças, dentre as quais destaca-se o mofo branco (ALVARENGA, 2013). A referida doença é causada pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary, o qual pertence ao Filo Ascomycota, Classe Discomycetes, Ordem Helotiales e Família Sclerotiniaceae (AMORIM et al., 2016). Trata-se de um patógeno que causa sérios problemas sob temperaturas amenas (15 °C a 21 °C) e alta umidade, principalmente em regiões serranas do país e em regiões do cerrado irrigadas com pivô central. O tomate destinado ao processamento, conhecido como tomate rasteiro, apresenta sérios problemas com esta doença (JONES et 1991; REIS et al., 2007).

Este fungo é extremamente agressivo no período de florescimento e fechamento da cultura, podendo afetar todos os órgãos da planta, com lesões pardo-escuras úmidas e por fim esbranquiçadas, com o anelamento total e conseqüente murcha da parte aérea. Pode haver a formação de micélio branco cotonoso e de escleródios, os quais podem se formar dentro da

medula do tronco, bem como na parte externa da haste (Figura 2) (JACCOUD FILHO et al., 2017).

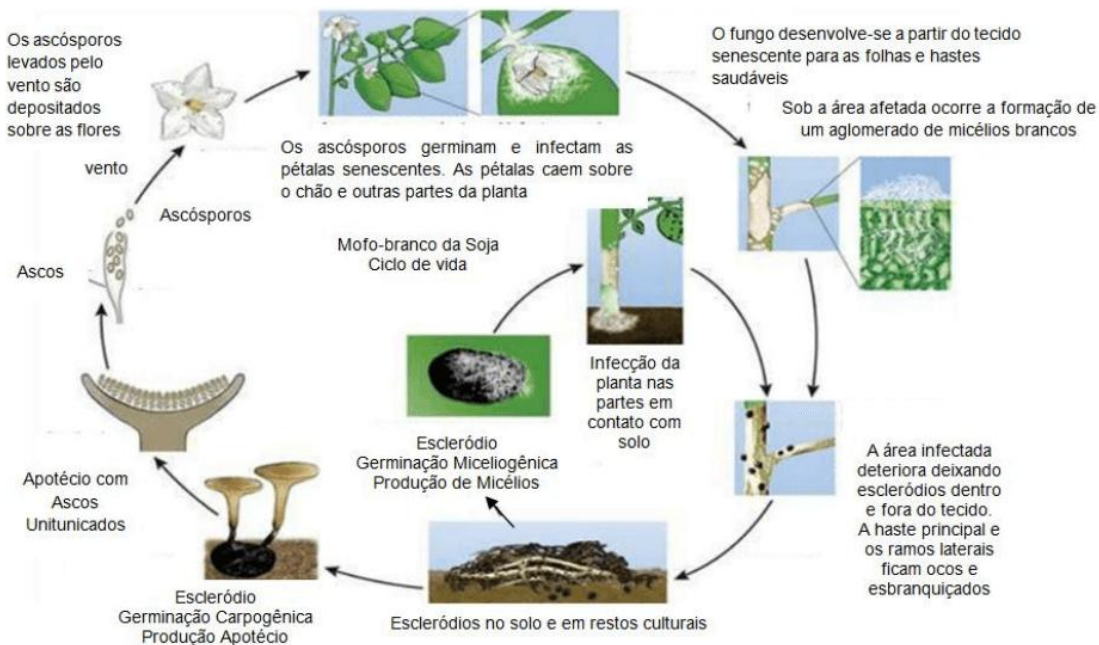


Figura 2 – Ciclo de vida do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*. Fonte: Adaptado de Wharton e Kirk 2007

Escleródios são estruturas de resistência enegrecidas formadas por um adensado de hifas, capazes de sobreviver em condições adversas durante anos. Estes germinam na superfície ou em profundidade, gerando apotécios (germinação carpogênica) e ascósporos que podem ser disseminados a longas distâncias, ou emitem micélio (germinação miceliogênica) que colonizam rapidamente as áreas sadias da planta (AMORIM et al, 2016; JACCOUD FILHO et al., 2017). Os apotécios são lisos, de coloração creme e podem apresentar de 4 até 10 mm de diâmetro, permanecendo viáveis entre 7 a 10 dias. Os ascos presentes em seu interior são de forma cilíndrica com 2 a 10 µm de diâmetro e entre 110 a 155 µm de comprimento e estes possuem ascósporos de forma elipsoidal (AMORIM et al., 2016) (Figura 3).



Figura 3 – (a) Placa de Petri com o fungo *Sclerotinia sclerotiorum* e escleródios formados; (b) escleródio germinado formando apotécio. Fonte: a autora

O controle deste patógeno baseia-se em métodos como a rotação de culturas; plantio em solo livre do patógeno; aração profunda para inversão da leiva do solo e pulverização com fungicidas prévia à colonização. Porém, este patógeno é polífago, acometendo 75 famílias de plantas e mais de 400 espécies, como soja, feijão, alface, batata, ervilha, repolho, girassol, com exceção à família das gramíneas, restringindo as opções para rotação de culturas, além de favorecer a disseminação da doença. Ademais, não há híbridos de tomateiro resistentes a *S. sclerotiorum* disponíveis no mercado (BOLAND e HALL, 1994; LEITE, 2005). Desta forma, o controle químico é o mais utilizado.

Atualmente 21 produtos são registrados no Brasil para o controle do mofo branco no tomateiro, com apenas 6 ingredientes ativos diferentes: Fluazinam, Tiofanato-metílico, Lufenurom, Procimidona, Ciprodinil e Fludioxonil (AGROFIT, 2020). Trabalhos demonstram maiores índices de controle com fenilpiridinilaminas (fluazinam) e carboxamidas (procimidona) (MEYER, 2013). Porém, nem sempre esta forma de controle é eficiente, devido à dificuldade de atingir os sítios de infecção e as estruturas de resistência no solo. Mueller et al.(2002), a partir da aplicação de fungicidas, averiguaram que a inibição do fungo na fase vegetativa e reprodutiva da cultura do feijoeiro foi ineficiente, pois a aplicação não atingiu toda a área. Desse modo, há a demanda de muitas pulverizações ao longo do ciclo da cultura na tentativa de conter a doença e a multiplicação do patógeno. Não eficiente, ocorre maior infestação no solo para as próximas safras, além de perdas na produção (REIS et al., 2007).

Assim, as restrições nos métodos de controle desencadeiam a demanda por um manejo integrado, abrangendo o controle químico, o cultural e o alternativo (JACCOUD FILHO et al., 2017), como a utilização de biocontroladores e a indução de resistência.

2.3 Controle biológico de doenças de plantas

O controle biológico (CB) de doenças consiste na utilização de organismos como fungos, bactérias, vírus, nematoides ou insetos como biocontroladores. Este termo foi utilizado pela primeira vez em 1919 para referir-se ao uso de inimigos naturais no controle de insetos-praga (WILSON e HUFFAKER, 1976), mas foi na década de 1980 que as discussões sobre o assunto iniciaram-se no Brasil, bem como o primeiro lançamento de um produto a base do fungo *Trichoderma viride* (MORANDI e BETTIOL, 2009).

O controle biológico pode ser classificado em duas formas diferentes: o natural e o aplicado. O controle biológico natural está relacionado à população de inimigos que ocorrem naturalmente no ambiente, já o aplicado constitui-se da liberação de biocontroladores reproduzidos em laboratório, com o objetivo de reduzir rapidamente a população da praga para seu nível de equilíbrio, muito utilizado na agricultura. O controle biológico está relacionado à utilização de um controle integrado, um conjunto de práticas de manejo como a rotação de culturas, manejo da palhada, sementes saudáveis e adubação equilibrada (MORAES e LEWIS, 2000; PARRA, 2000).

O CB é um método de controle que não utiliza compostos químicos como o inseticida e o fungicida, logo os impactos ao meio ambiente são significativamente inferiores quando comparados ao controle químico. Além disso, a resistência dos patógenos, causada pelo uso contínuo do mesmo princípio ativo, que ocorre como uso de controle químico, não é um problema quando utiliza-se o CB (BERTI FILHO e MACEDO, 2011).

A utilização do CB pode proporcionar o controle de estruturas de resistência como os escleródios do mofo branco, causada por *S. sclerotiorum*, em que muitas vezes, o controle químico não é efetivo. Os agentes biológicos são, portanto, os organismos capazes de diminuir a incidência de doenças, mantendo um nível que não cause danos econômicos à lavoura. As bactérias, principalmente as do gênero *Bacillus*, são muito utilizadas no controle biológico de doenças de plantas, havendo no mercado diversos produtos formulados a base destes microrganismos. A ação destas bactérias assim como outros biocontroladores é direta sobre o patógeno, e a sua aplicação é posterior a presença da doença (BARROS et al., 2015;

RENZI et al., 2019), diferente ao que ocorre na indução de resistência, onde a aplicação e ação do agente indutor é prévia a infecção da doença (STANGARLIN et al., 2011).

2.4 Indução de resistência

As plantas apresentam um arsenal de defesa, inatos à elas, contra o ataque de patógenos. A indução de resistência é caracterizada pela ativação e aumento destes mecanismos de defesa já existentes, porém latentes, quando submetidas a agentes indutores que podem ser bióticos ou abióticos (PASCHOLATI e DALIO, 2018). A indução de resistência é conhecida há muito tempo, porém, foi nos últimos anos que estudos aprofundados e específicos foram realizados com diversas espécies de plantas, mostrando-se eficiente na inibição de fungos, vírus, bactérias, insetos, ácaros e nematoides (STANGARLIN et al, 2011; SONG et al., 2015).

A proteção pode ocorrer nas partes não tratadas da planta, logo, não se limita apenas às partes onde o tratamento foi aplicado (HAMMERSCHMIDT et al., 2001). As substâncias relacionadas à defesa são, em geral, sintetizadas somente após a ativação, evitando gasto energético desnecessário. Quando uma planta é induzida, não é considerado imunidade, pois a doença pode acontecer, porém em menor intensidade. Além disso, a indução de resistência não altera o genoma da planta, apenas ativa mecanismos latentes que são inatos à ela (AGRIOS, 2004; STANGARLIN e LEITE, 2008).

Há uma vasta gama de agentes capazes de induzir respostas de resistência nas plantas, os quais são chamados de agentes indutores e podem ser bióticos e abióticos. Os agentes indutores ou ativadores de resistência podem ser microrganismos saprofíticos; metabólitos de microrganismos; extratos de plantas e óleos essenciais; o próprio fitopatógeno; compostos químicos como ácido salicílico e ácido jasmônico; medicamentos homeopáticos, entre outros (HAMMERSCHMIDT et al., 2001; AGRIOS, 2004; DI PIERO et al., 2005; RESENDE et al., 2007; MIORANZA et al., 2017; FARAHANI e TAGHAVI, 2017) (Figura 4).

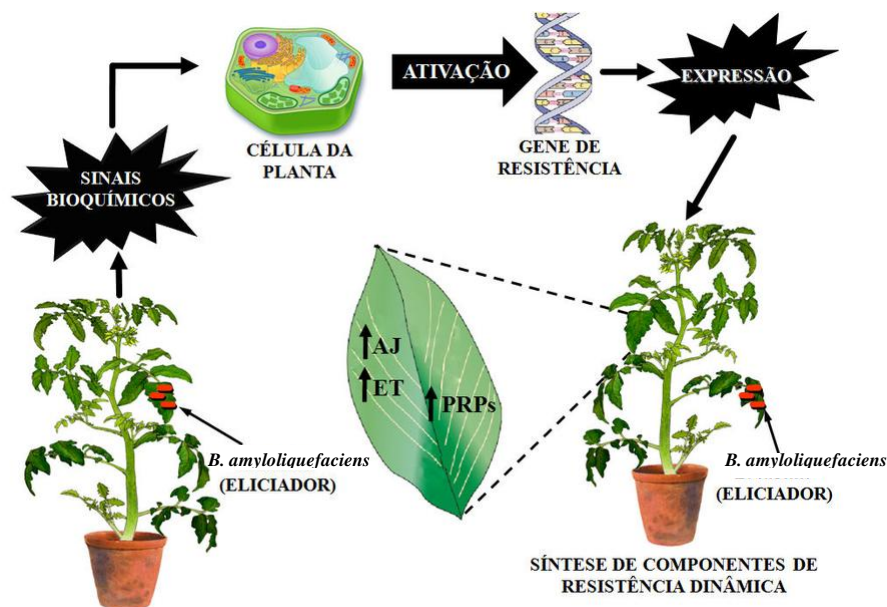


Figura 4 – Esquema do fenômeno de resistência sistêmica induzida (ISR), ocasionada pelo agente de biocontrole *Bacillus amyloliquefaciens*. Fonte: Adaptado de Lanna Filho et al., 2010

Os patossistemas envolvendo a cultura do tomateiro vêm sendo estudados no âmbito da indução de resistência, como alternativa para o manejo integrado de fitopatógenos. Em estudo realizado por Itako et al. (2012), evidenciaram-se a eficiência de produtos à base de piraclostrobina juntamente com acibenzolar-S-metil na indução da atividade das enzimas peroxidase, polifenoloxidase e β -1,3-glucanase e no controle da mancha bacteriana (*Xanthomonas perforans*) do tomateiro.

Farahani e Taghavi (2017) avaliaram se polissacarídeos do patógeno têm a capacidade de induzir resistência em tomateiro contra *X.perforans*. Os resultados mostraram que o pré-tratamento com polissacarídeos leva ao aumento da resistência do tomate contra *X. perforans* através do acréscimo da expressão de β -1,3-glucanase (GLU), fenilalanina amônia-liase (PAL) e catalase (CAT). Song et al. (2011) demonstraram ativação da resistência em plantas de tomateiro contra o patógeno *Alternaria solani*, com o uso de ácido abscísico exógeno, que culminou na ativação da fenilalanina amônia-liase, polifenoloxidase e peroxidase.

A planta apresenta mecanismos de defesa estruturais e bioquímicos, os quais podem ser pré ou pós formados. Mecanismos estruturais estão relacionados com o bloqueio à penetração do patógeno como as papilas, halos, tiloses e lignificação da parede celular, enquanto que os bioquímicos são substâncias com a capacidade de interferir ou inibir o seu desenvolvimento,

como a síntese de espécies reativas de oxigênio (EROs), síntese de proteínas relacionadas a patogênese (PRPs) e acúmulo de fitoalexinas (PASCHOLATI e DALIO, 2018).

Os mecanismos pré formados já existem na planta antes da chegada de um agente agressor, enquanto que os mecanismos pós formados são ativados em resposta à presença do patógeno e estão relacionados à indução de resistência (STICHER et al., 1997; STANGARLIN et al., 2011; LEHMANN et al., 2015; PASCHOLATI e DALIO, 2018).

2.4.1 Proteínas relacionadas à patogênese (PRPs)

Atualmente são conhecidas 17 famílias de enzimas de PRPs, classificadas de acordo com características genéticas e numeradas de acordo com ordem de descoberta. Sabe-se que estas, em princípio, protegem a planta do ataque por pragas e doenças (GORJANOVIC, 2009).

A síntese de proteínas relacionadas à patogênese (PRPs) é o mecanismo mais expressivo resultante da interação entre a planta e o patógeno. Quando há a indução pela presença do patógeno ou de um elicitador, pode ocorrer uma grande alteração na quantidade de proteínas que estão presentes ou inativadas no tecido vegetal, codificadas por genes da planta, indicando a ativação dos mecanismos de defesa. O acúmulo sistêmico destas PRP's pode ser advindo do sinal de compostos como ácido salicílico, etileno, sistemina e jasmonato (PASCHOLATI e DALIO, 2018).

A partir da indução, uma cascata de sinais é ativada resultando na ativação da expressão gênica e então síntese de PRPs. Dentre elas pode-se citar a peroxidase, polifenoloxidase, catalase, β -1,3- glucanase e fenilalanina amônia-liase (FILIPENKO et al., 2013; SHAH et al., 2014). O ataque de patógenos, dentre outros estresses acometidos às plantas, induzem ao estresse oxidativo, que é a produção acentuada de espécies reativas de oxigênio (EROs) que causam danos oxidativos em proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. Dentre as principais EROs presentes no metabolismo celular de plantas, pode-se citar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), capaz de romper a membrana do núcleo e causar danos ao DNA (STANGARLIN et al., 2011; BARBOSA et al., 2014).

As EROs atuam como moléculas sinalizadoras para a expressão de genes envolvidos nos mecanismos de defesa. Para combater o estresse oxidativo causado pelas EROs, as plantas utilizam seus sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos para desintoxicar as células. Dentre as enzimas antioxidativas liberadas para dismutar estes EROS, pode-se citar a

catalase (E.C. 1.11.1.6) e a peroxidase (E.C 1.11.1.7). Tais enzimas são expressas em conjunto quando ocorre o estresse oxidativo e atuam em diferentes partes da célula (SHARMA et al., 2012; BARBOSA et al., 2014; RECZEK e CHANDEL, 2015).

2.3.1.1 Peroxidase (POD), (E.C 1.11.1.7)

A enzima peroxidase (POD) está envolvida no crescimento e desenvolvimento vegetal a partir do catabolismo de auxinas, na destoxificação celular e em mecanismos de defesa como lignificação, cicatrização de ferimentos e oxidação de compostos fenólicos. Esta enzima oxida material orgânico através da eliminação do H_2O_2 no citosol e cloroplastos, utilizando os compostos fenólicos como doadores de elétrons (BAYSAL et al., 2003; LOCATO et al., 2010).

A família a qual ela pertence é a PR-9, incluída à classe III, localizadas nos vacúolos e paredes celulares. As PODs apresentam muitas isoformas, o que as permite estar presente em vários processos fisiológicos durante o ciclo de vida da planta. De maneira geral, são induzidas a partir da infecção por patógenos, bem como por injúrias (VAN LOON et al., 2006; BROETTO, 2014). Assim, PODs estão relacionadas à defesa vegetal, podendo atuar de forma direta sobre patógenos e também de forma indireta, a partir de vias de sinalização relacionadas a vários processos fisiológicos em plantas, em especial as respostas de defesa (PINTO et al., 2011).

2.3.1.2 Catalase (CAT), (E.C. 1.11.1.6)

A enzima catalase (CAT) também está relacionada à redução do excesso de EROs, detoxificando o H_2O_2 , removendo-os dos peroxissomos convertendo-os em oxigênio (O_2) e água (H_2O), prevenindo os efeitos nocivos causados por mudanças na homeostase de H_2O_2 . A atividade da CAT é evidente e eficaz, principalmente em altas concentrações de H_2O_2 , logo, é uma importante enzima em condições de estresse severo (SEDLAROVA et al., 2007; DUBEY, 2010).

Esta enzima foi a primeira enzima descrita e em especial apresenta características inerentes. Apenas uma molécula pode apresentar a capacidade de catalisar a decomposição de até 40 milhões de moléculas de H_2O_2 por segundo (SHARMA et al., 2012; BROETTO, 2014).

Além disso, não demanda de redutores, sendo muito eficiente na questão energética, com alto ganho de energia celular (MALLICK e MOHN, 2000).

As CATs são classificadas de acordo com o local de sua expressão e função. Na classe 1 estão as CATs expressas em tecidos que realizam fotossíntese e reguladas pela luz, onde o H₂O₂ produzido durante a fotorespiração é removido. A classe 2 compreende as CATs produzidas em sua maioria nos tecidos vasculares, podendo exercer uma função de lignificação. Na classe 3 estão as CATs presentes nas sementes e plântulas, que removem o H₂O₂ produzido no processo de degradação dos ácidos graxos no glioxissoma (WILLEKENS et al., 1997).

2.3.1.3 Polifenoloxidase (PPO),(E C 1.10.3.2)

A polifenoloxidase atua de maneira parecida às PODs e CATs, porém apresenta substratos diferentes. Elas catalisam a oxidação dependente de oxigênio de fenóis. Um destes fenóis é o ácido clorogênico e o produto da sua oxidação pode dificultar a entrada de patógenos na planta, a partir da formação de barreiras fenólicas polimerizadas na parede celular, e/ou gerarem um ambiente desfavorável para o desenvolvimento do patógeno. Logo, também atuam na defesa da planta contra patógenos (LI e STEFFENS, 2002).

As PPO apresentam diversas funções na planta, tais como a pigmentação dos tecidos, regulação do consumo de oxigênio durante o processo de fotorespiração e proteção de plantas contra pragas e doenças. Os compostos fenólicos produzidos próximo ao local das lesões ocasionadas pelo patógeno são oxidados por esta enzima, resultando no aparecimento de substâncias escuras provenientes da polimerização oxidativa das quinonas. As polifenoloxidases, assim como PODs e CATs, acumulam-se em altas concentrações em tecidos infectados, sendo extremamente relevantes nos mecanismos de defesa das plantas (CONSTABEL e RYAN 1998; BINDSCHEDLER et al. 2002; PINTO et al., 2011; PASCHOALTI e DALIO 2018).

2.3.1.4 Fenilalanina amônia liase (PAL), (EC 4.3.1.5)

A fenilalanina amônia liase atua na síntese de monômeros de lignina, ácido salicílico, fitoalexinas e flavonóides, além de ser indispensável para a biossíntese de fenilpropanóides, logo, é um fator limitante para a síntese destes compostos pela planta. Dessa forma, observa-

se que a atividade de PAL é diretamente proporcional à síntese de compostos fenólicos (GERASIMOVA et al., 2003).

A PAL atua na desaminação da L-fenilalanina, transformando-a em ácido *trans*-cinâmico e amônia. Estes processos levam às reações que geram componentes como a lignina, alguns pigmentos e protetores de luz UV (MARGIS-PINHEIRO et al., 1999; SCHWAN-ESTRADA et al., 2008). Esta enzima pode ser induzida por fatores como injúrias, luz, metais pesados, bem como pelo ataque do patógeno, acumulando-se em células próximas ao sítio de infecção (GERASIMOVA et al., 2003).

2.3.1.5 β -1,3-glucanases (GLU), (EC 3.2.1.6)

As β -1,3-glucanases pertencem à família PR-2 e atuam na parede celular e nos esporos dos fungos, hidrolisando um dos principais componentes: a β -1,3-glucana. A hidrólise da β -1,3-glucana ocorre pela quebra de suas ligações glicosídicas do tipo β -1,3, liberando, principalmente, glicose. É uma enzima prontamente induzida, mesmo que pouco expressa constitutivamente (WU e BRADFORD, 2003; PASCHOLATI e DALIO, 2018).

Elas podem ocorrer e agir dentro das células (endoglucanases), apresentando forma ácida, ou fora das células (exoglucanases) (MARTINS, 2008). Apesar de não serem produzidas apenas pelas plantas, mas também por organismos como as bactérias, fungos e alguns invertebrados (BAUERMEISTER et al., 2010), é nas plantas que se destacam, principalmente por atuarem na sua defesa contra patógenos. Os fragmentos glicosídicos liberados da parede celular fúngica e da parede celular da própria planta, pelo processo de hidrólise da β -1,3-glucana, atuam como elicitores, induzindo mecanismos de defesa da planta contra patógenos (PASCHOLATI e DALIO, 2018).

2.5 Rizobactérias promotoras de crescimento como agentes indutores de resistência

Rizobactérias são bactérias da rizosfera com capacidade de colonizar as raízes das plantas na presença da microbiota natural do solo. A interação entre bactérias e raízes de plantas pode ser benéfica, prejudicial ou neutra (SCHIPPERS et al., 1987). As rizobactérias benéficas são encontradas na rizosfera de diversas culturas e 2 a 5% dos isolados dessas rizobactérias podem apresentar efeito positivo no crescimento de plantas. Aquelas que exercem efeito benéfico no desenvolvimento de plantas através da promoção do crescimento

e/ou, proteção contra organismos patogênicos são chamadas de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs) ou PlantGrowth-Promoting Rizobacteria (PGPR). Entre as PGPR, destacam-se as dos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus* e actinobacterias do gênero *Streptomyces* (KLOEPPER et al., 1990).

As RPCPs têm como principal característica a capacidade de colonizar a rizosfera e, assim, estimular o seu crescimento a partir da produção de fitohormônios, tais como auxinas, citocininas e giberelinas, que são responsáveis pelo crescimento de plantas, desenvolvimento de raízes secundárias e pelos radiculares. Dessa forma, a absorção de água e sais minerais é aprimorada, reduzindo a vulnerabilidade da planta aos estresses abióticos e bióticos (VIEIRA JUNIOR, 2013).

Rizobactérias têm sido estudadas há vários anos devido a sua capacidade de aumentar o crescimento de plantas (BROWN, 1974; HAYAT et al., 2010) e nos últimos anos, o uso de PGPR tem sido uma alternativa eficiente no controle de doenças, bem como fertilizantes e indutores de resistência, pois possuem como característica antagonista a produção de compostos antimicrobianos como compostos voláteis, enzimas hidrolíticas, compostos solúveis, além de serem altamente competitivas por recursos do meio (MACHADO et al., 2012; QIAO et al., 2014; LI et al., 2015; SINGH et al., 2016; BRAGA JR. et al., 2017).

As rizobactérias, promotoras de crescimento, vêm sendo estudadas como controladores biológicos e trabalhos demonstram seu potencial no controle direto e indireto de diversos patógenos, bem como na indução de resistência (LI et al., 2015; SINGH et al., 2016).

2.4.1 *Bacillus amyloliquefaciens*

O gênero *Bacillus* é amplo e significativo em relação ao controle de fitopatógenos. A espécie *Bacillus amyloliquefaciens* é considerada uma RPCP, portanto, não é fitopatogênica. Habita naturalmente solos de praticamente todas as regiões do planeta (MENG et al., 2012), sendo conhecida por sua elevada capacidade em produzir metabólitos secundários com potencial antagonista à microorganismos (GOPAL et al., 2015).

Durante anos a espécie foi classificada como *B. subtilis* subsp. *amyloliquefaciens*, devido às suas similaridades. No entanto, estudos demonstraram diferenças em seus genomas, levando à classificação como uma nova espécie (PRIEST et al, 1987). *B. subtilis* dedica 4,5% de todo o seu genoma para a síntese de metabólitos secundários, diferenciando-se da nova espécie *B. amyloliquefaciens*, que dedica 8.5% de um genoma total de aproximadamente 340

kb. *B. amyloliquefaciens* pode atuar de diferentes maneiras sobre o patógeno: através de competição por recursos no meio, produção de compostos antimicrobianos solúveis e/ou por emissão de compostos voláteis antimicrobianos (VINODKUMAR et al., 2017; GUEVARA-AVENDAÑO et al., 2018).

Esta espécie de bactéria é móvel, gram-positiva e é em forma de bastonete. Possui como característica a produção de endósporos, os quais podem sobreviver durante anos em condições adversas, como temperaturas extremas, diferentes pHs, salinidade, assim como à aplicação de fungicidas e inseticidas. Tal fato proporciona a esta espécie maior resistência, bem como, quando utilizadas no controle de doenças, maior flexibilidade de aplicação quando comparadas aos agroquímicos. A espécie ainda proporciona maior resistência à perda de água pelas plantas e ao ataque de patógenos a partir da produção de um biofilme ao redor das raízes (QIAO et al., 2014, GOPAL et al., 2015).

Os metabólitos produzidos pela referida espécie podem agir diretamente sobre o patógeno através da inibição de crescimento, ou, então, indiretamente, como elicitores, induzindo a ativação de mecanismos de defesa da planta. Dentre os metabólitos produzidos, destacam-se os lipopeptídeos bacilomicina D, fengicina, surfactina e inturina, que atuam na membrana do patógeno; os policetídeos macrolactina e bacilaene; compostos voláteis, como a acetoína; e enzimas hidrolíticas como celulase, amilase, protease e quitinase, que possuem ação direta, destruindo a parede celular da cutícula de nematóides e fungos fitopatogênicos (YAO et al. 2003; AGRIOS, 2004; CHEN et al., 2009; GROVER et al. 2010).

A bactéria da espécie *B. amyloliquefaciens* possui diversas cepas que apresentam diferentes níveis de atividade antimicrobiana, bem como produzem diferentes compostos antagonistas. Diversos trabalhos demonstram o potencial de diferentes cepas desta espécie como biocontroladoras, agindo por antagonismo direto contra o patógeno, e/ou como elicitoras na indução de mecanismos de resistência em plantas. A partir disso, a utilização desta espécie no manejo de doenças de plantas é uma alternativa para a utilização no manejo integrado e/ou no cultivo de plantas orgânicas, onde não se utiliza agroquímicos, principalmente para patógenos de difícil controle (LI et al., 2015; CHOWDHURY et al., 2015).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Controle Alternativo e Indução de Resistência em Plantas a Patógenos e em casa de vegetação da Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR, (23°24'13.703"S; 51°56'30.107" W) no período de março de 2018 a dezembro de 2019.

3.1 Obtenção e manutenção dos isolados das bactérias com potencial antagonista

As bactérias RB1, RB2 e RB3 foram isoladas a partir da diluição do solo da rizosfera do tomateiro e de folhas de tomateiro em placas de Petri contendo meio de cultura ágar nutriente (AN). Os três isolados foram selecionados por apresentarem halos de inibição a outros microrganismos presentes na placa (Figura 5). Foram realizadas múltiplas repicagens em placas com meio ágar nutriente, até obtenção de culturas puras. Os isolados foram conservados em tubos de ensaio e placas de Petri contendo meio caldo nutriente (CN) e meio AN, respectivamente e mantidos em BOD a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$, no escuro.



Figura 5 - Halo de inibição gerado por um dos isolados de rizobactéria (RB1) aos demais microrganismos presentes em placa de Petri com meio AN, após 7 dias de incubação. Fonte: a autora

3.2 Isolado de *Sclerotinia sclerotiorum*

O fungo *S. sclerotiorum* foi cedido pelo Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa-PR e este foi obtido de escleródios

coletados em lavoura de soja, no município de Ventania/PR. O fungo foi mantido em placas de Petri com meio BDA em BOD a $24\pm 2^\circ\text{C}$, 12h fotoperíodo.

3.3 Confronto direto e compostos voláteis

Os isolados bacterianos foram utilizados em testes de confronto direto com *S.sclerotiorum*, pelo método de pareamento de culturas em placas de Petri proposto por Dennis & Webster (1971) com adaptações. Para isto, um disco do micélio do fungo foi disposto a 1cm de uma das extremidades da placa de Petri contendo meio BDA e nesta mesma placa, paralelo ao fungo, a 1cm da extremidade, o isolado bacteriano foi repicado (Figura 6a). Para o teste de compostos voláteis, o mesmo processo foi realizado, porém, em placas subdivididas, evitando assim, o contato direto entre os microrganismos (Figura 6b).

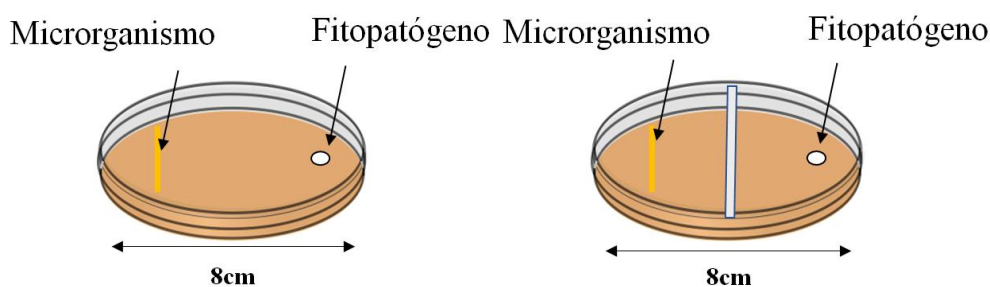


Figura 6 – (a) Esquema do teste de confronto direto e (b) do teste de compostos voláteis

O crescimento micelial foi aferido diariamente, a partir de 24h após a incubação, pelo método de medidas diametralmente opostas. A partir disso, foi calculada a área abaixo da curva do crescimento micelial (AACCM) (SHANER e FINNEY, 1977) e a porcentagem de inibição do crescimento micelial (ICM) (SHANER e FINNEY, 1977) por meio das fórmulas a seguir:

$AACCM = \sum \{ [(y_i + y_{i+1}) / 2] * d \}$, onde y_i e y_{i+1} são os valores de crescimento micelial observados em duas avaliações subsequentes e d é o intervalo entre as avaliações.

$ICM = [(ac - at) / ac] * 100$, onde ac é área de crescimento micelial do controle e at área de crescimento micelial do tratamento.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com 7 repetições, sendo cada placa uma unidade amostral. Os dados foram analisados no software R

(IHAKA & GENTLEMAN, 1996) e as médias foram comparadas a partir do teste de SkottKnott a 5% de probabilidade de erro.

3.4 Sequenciamento e manutenção do isolado

Posteriormente à realização do teste de confronto direto e compostos voláteis, o isolado que apresentou melhor potencial antagônico a *S. sclerotiorum* foi enviado para identificação por sequenciamento de DNA no Laboratório de Fisiologia e Genética de Microrganismos, Departamento de Biologia na Universidade Federal de Lavras. Este foi confirmado como *B. amyloliquefaciens* cepa PKM16 (PKM16) com 98% de similaridade (Acesso [KF732989.1](#)). O isolado PKM16 foi então mantido em tubos de ensaio e placas de Petri contendo meio CN e AN respectivamente, em BOD a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$, no escuro.

3.5 Determinação da concentração do mix e do mix autoclavado

As concentrações 0, 20, 30, 40 e 50% do mix (metabólitos produzidos crescimento bacteriano+células bacterianas vivas) e do mix autoclavado de *B. amyloliquefaciens* PKM16 no controle de *S. sclerotiorum* foram testadas *in vivo* e *in vitro*. Para obtenção do mix e do mix autoclavado, 1mL de solução bacteriana (OD600:0.6, cubeta de vidro), que havia sido previamente incubada por 48h, $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ e no escuro em meio caldo nutriente, foi adicionada em erlenmeyers com 210 mL de meio CN esterilizado. Os erlenmeyers, foram incubados em mesa agitadora por 48h, 180 rpm, $28\pm 2^{\circ}\text{C}$, no escuro. A concentração bacteriana final foi aferida em espectrofotômetro a 600nm, em cubeta de vidro.

No teste *in vitro*, o tratamento autoclavado foi preparado a partir da adição do caldo de crescimento, com 48 horas de agitação, em Erlenmeyers contendo meio BDA nas respectivas concentrações e posteriormente autoclavado (121°C , 1 atm, 25 min). Para preparar o mix, após 48 horas em agitação, o caldo de crescimento bacteriano foi adicionado em Erlenmeyers contendo meio BDA fundente previamente autoclavado (121°C , 1 atm, 25 min). A mistura foi realizada quando a temperatura do meio de cultura estava em aproximadamente 45°C . Utilizaram-se as concentrações de 0, 20, 30, 40 e 50% do caldo bacteriano (Figura 7a).

O meio de cultura com as diferentes concentrações do mix e mix autoclavado, foi vertido em placas de Petri de 8 cm de diâmetro. Após a solidificação do meio, um disco de 8 mm do micélio de *S. sclerotiorum*, previamente incubado em BDA por 7 dias, foi adicionado

nas placas, as quais foram incubadas a 20°C (Figura 7b). O crescimento micelial foi aferido diariamente por meio do método de medidas diametralmente opostas, a partir de 24h de incubação, até o momento em que o patógeno submetido a testemunha cobrisse completamente a placa. Em base disso, foi calculada área abaixo da curva do crescimento micelial (AACCM) e inibição do crescimento micelial (ICM), pelas fórmulas citadas no item 3.2.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com 6 repetições, sendo cada placa uma unidade amostral. Os dados foram analisados no software R (IHAKA & GENTLEMAN, 1996) e as médias foram comparadas com teste de SkottKnott a 5% de probabilidade.

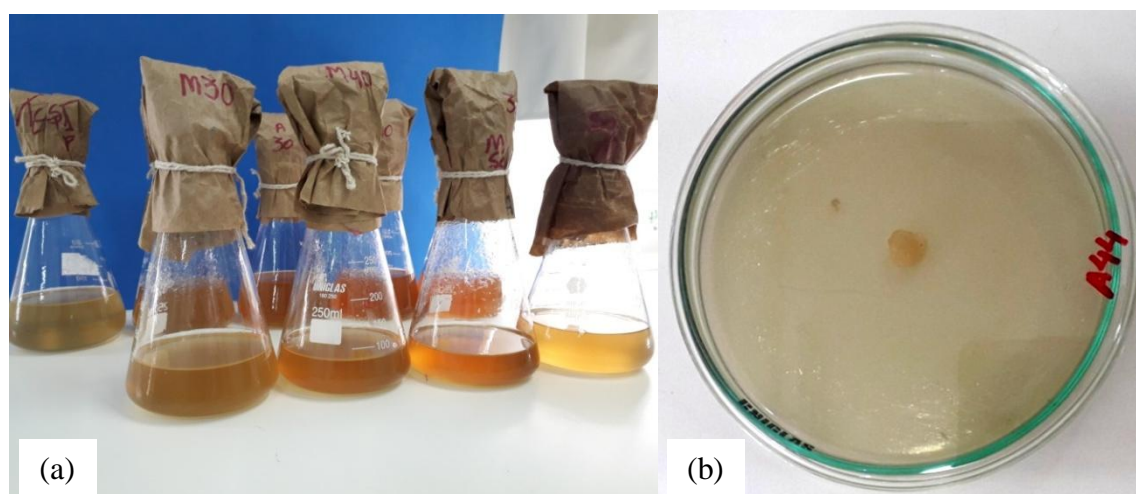


Figura 7 - (a) Erlenmeyers contendo meio de cultura BDA+mix autoclavado de PKM16 e meio de cultura autoclavado fundente pronto para receber mix de PKM16; (b) Placa de Petri com meio de cultura + tratamento solidificado e disco de micélio de *Sclerotinia sclerotiorum*. Fonte: a autora

Para o teste *in vivo*, sementes de tomate cv. Micro-Tom foram semeadas em bandejas de poliestireno 128 células, com substrato MecPlant®. O transplante foi realizado 22 dias após a semeadura (DAS), em copos de 500mL contendo solo:areia:substrato MecPlant® (1:1:2 v:v:v) (Figura 8) e foram adubados com NPK (1 g de NPK 10.10.10 por litro de substrato).

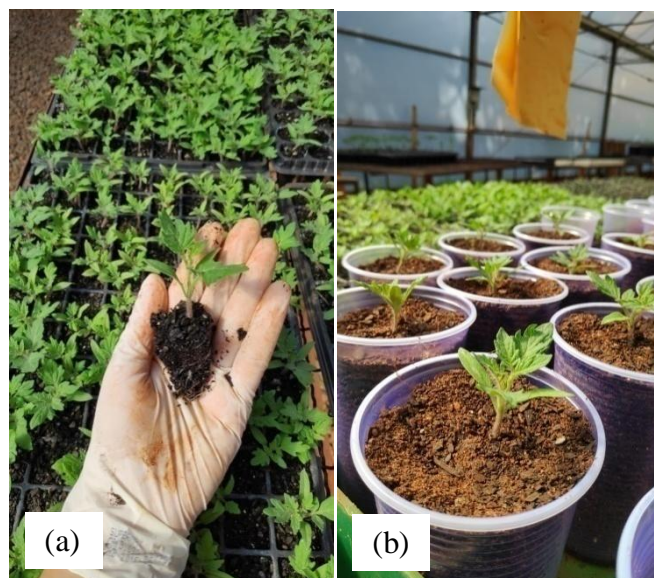


Figura 8 – (a) Mudanças de tomate Micro-Tom antes do transplante; (b) Transplante de mudas de tomate Micro-Tom 22 dias após a semeadura. Fonte: a autora

A diluição dos tratamentos mix e mix autoclavado nas concentrações de 0, 20, 30, 40 e 50% foi realizada em água destilada autoclavada. Nos tratamentos o Tween20 foi adicionado à suspensão a uma concentração de 0,01% como surfactante (uma gota por cada 300 mL de suspensão). Quando as plantas apresentavam estágio vegetativo de 5 folhas verdadeiras (29 DAS) foi realizada a aplicação dos tratamentos em cada unidade amostral correspondente (Figura 9) sobre toda a planta até o ponto de escoamento.

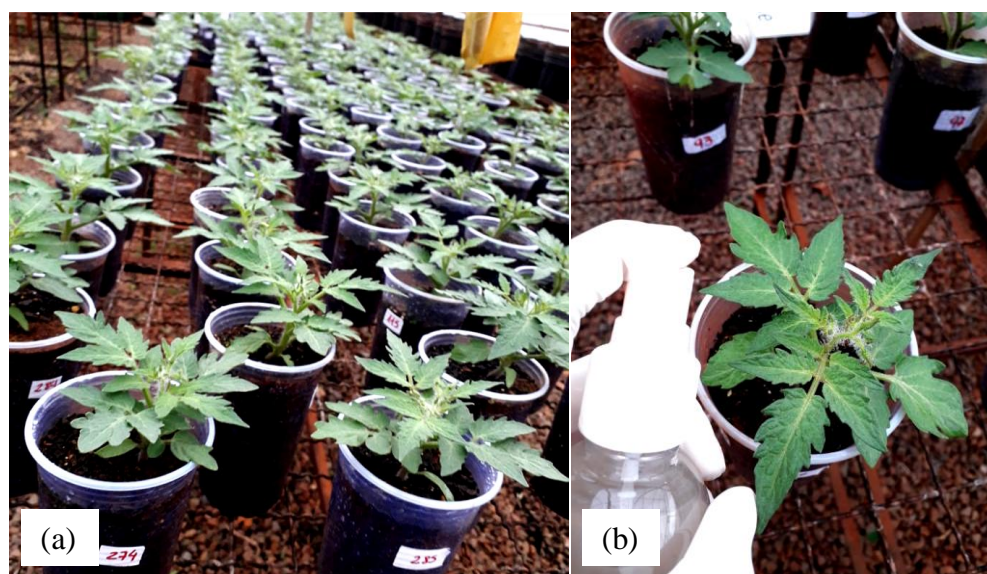


Figura 9 – (a) Estádio fenológico de 5 folhas verdadeiras de plantas de tomate Micro-Tom e (b) aplicação dos tratamentos com aspersor manual. Fonte: a autora

Após 72h da aplicação dos tratamentos, foi realizada a inoculação do patógeno (previamente incubado por 7 dias a $20\pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 12h) pelo método da ponteira. Este consiste no corte da terceira folha verdadeira do tomateiro, 2 cm de distância da haste principal e adição da ponteira com micélio do patógeno (HOFFMAN et al., 2002). As plantas foram acondicionadas em câmara úmida e em temperatura de $18\pm 2^\circ\text{C}$ para favorecer o desenvolvimento da doença (Figura 10).

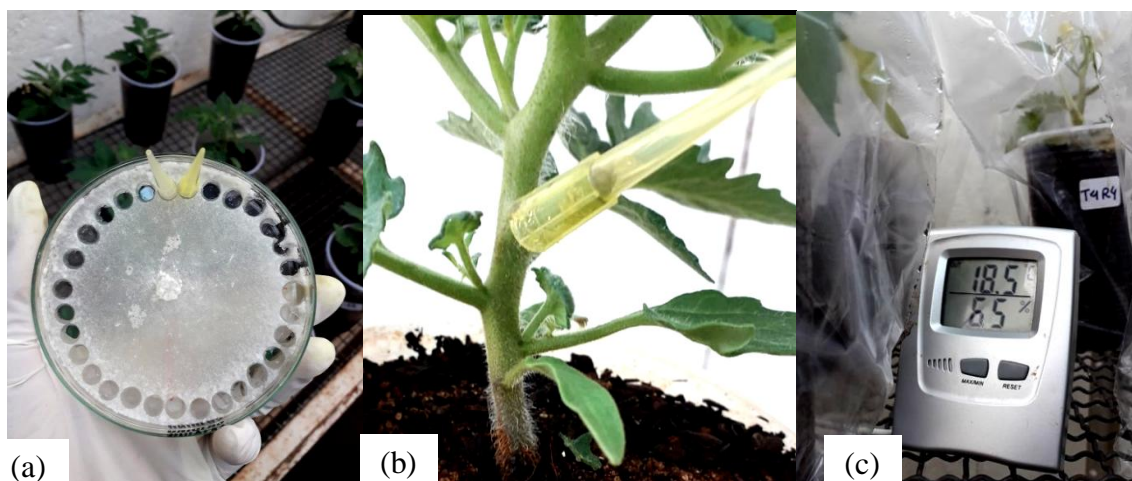


Figura 10 – (a) Placa com o fungo *Sclerotinia sclerotiorum* e ponteiras; (b) Inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum* pelo método da ponteira; (c) Incubação das plantas após inoculação. Fonte: a autora

As avaliações foram realizadas 2 dias após a inoculação, quando a doença chegou até a haste principal (Figura 11). Com o auxílio de um paquímetro, foi aferido o desenvolvimento da doença na haste, em comprimento (em cm), durante 5 dias. Com os dados obtidos, foi calculada a área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) e porcentagem de inibição de crescimento (PIC) através das seguintes fórmulas:

$AACPD = \sum \{ [(y_i + y_{i+1}) / 2] * d \}$, onde y_i e y_{i+1} são os valores de crescimento micelial observados em duas avaliações subsequentes e d é o intervalo entre as avaliações.

$PIC = [(cc - ct) / cc] * 100$, onde cc é crescimento do controle e ct é crescimento do tratamento.

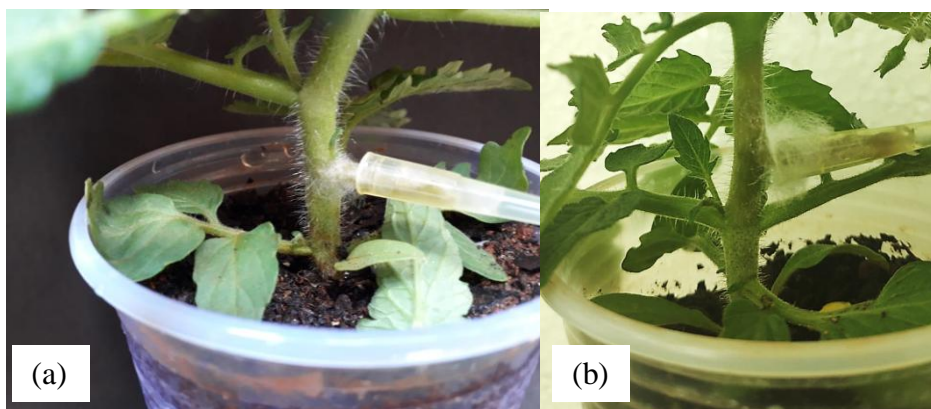


Figura 11 – (a) Sintoma de *Sclerotinia sclerotiorum* na haste principal da planta de tomateiro Micro-Tom no início da infecção; (b) Micélio branco cotonoso crescendo sobre a haste e lesão pardo escura encharcada. Fonte: a autora

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com 6 repetições, sendo cada planta uma unidade amostral. Os dados foram analisados no software R (IHAKA & GENTLEMAN, 1996) e as médias foram comparadas a partir do teste de SkottKnott a 5% de probabilidade de erro.

3.6 Efeito residual dos tratamentos

As sementes de tomate Micro-Tom foram semeadas em bandejas de poliestireno 128 células, com substrato MecPlant® e transplantadas 22 dias após a semeadura (DAS) com 1 par de folha verdadeira e 1 folha já formada, em vasos de 500 mL contendo solo:areia:substrato MecPlant® (1:1:2; v:v:v). A adubação foi realizada com NPK (1 g de NPK 10.10.10 por litro de substrato). A aplicação dos tratamentos ocorreu quando as plantas de tomate Micro-Tom apresentavam 5 folhas verdadeiras (29 DAS).

Os tratamentos foram mix 20% e mix autoclavado 20% de PKM16, testemunha composta por água destilada autoclavada e produto comercial biológico a base de *Bacillus subtilis* em concentração recomendada (2 a 4 L/ha; 500 – 1000 L/ha) (Figura 12).



Figura 12 - Tratamentos água destilada autoclavada (T), produto comercial a base de *Bacillus subtilis* (PC), mix autoclavado 20% de PKM16 (A) e mix 20% de PKM16 (M). Fonte: a autora

Para o preparo do mix e mix autoclavado, o caldo de crescimento bacteriano de PKM16 foi preparado, utilizando-se 1 mL de solução bacteriana (OD600:0.6, cubeta de vidro), previamente incubada por 48h em meio caldo nutriente, a $28\pm 2^\circ\text{C}$ e no escuro, que foi adicionada em 210 mL de meio caldo nutriente. Os erlenmeyers contendo a solução e meio de cultura, foram mantidos em mesa agitadora por 48h, 180 rpm, $28\pm 2^\circ\text{C}$ (Figura 13).

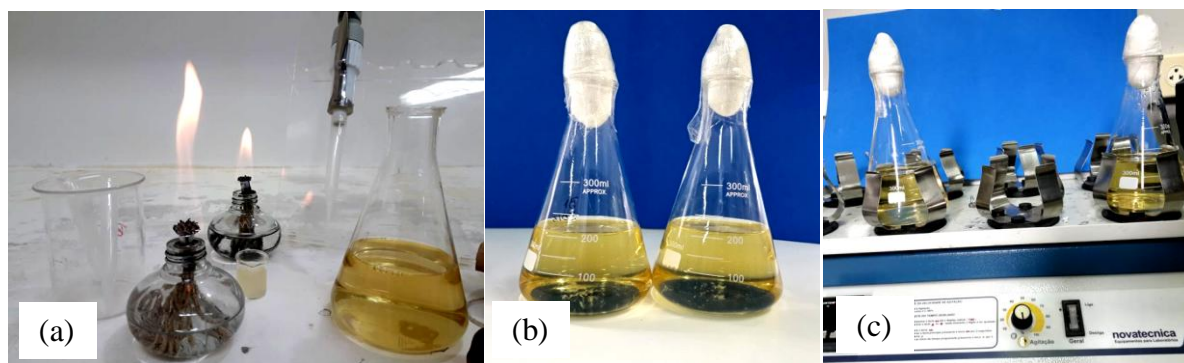


Figura 13 – (a) Preparo de mix e mix autoclavado de PKM16 em ambiente estéril; (b) Erlenmeyers com meio de cultura e solução bacteriana; (c) Agitação de Erlenmeyers em mesa agitadora 180 rpm, $28\pm 2^\circ\text{C}$. Fonte: a autora

Utilizou-se água autoclavada destilada para obter-se a diluição de 20% e Tween20 (0,01%) foi adicionado à suspensão como surfactante. Os tratamentos foram aplicados sobre as folhas da planta até o ponto de escurimento. O patógeno foi inoculado, pelo método da ponteira, nos tempos de 0, 24, 48, 72, 96, 122 e 144h após a aplicação dos tratamentos. As

plantas foram acondicionadas em câmara úmida utilizando-se de saco plástico umedecido com água destilada esterilizada e mantidas em temperatura de $18\pm 2^{\circ}\text{C}$.

As avaliações foram realizadas 2 dias após a inoculação, momento de início da doença na haste principal. O desenvolvimento da doença na haste foi aferido com o auxílio de um paquímetro a partir do comprimento ao longo da haste principal. As avaliações foram realizadas durante 5 dias após as respectivas inoculações, totalizando 11 dias de avaliação. Posteriormente foi calculada a AACPD. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com 6 repetições, sendo cada planta uma unidade amostral. Os dados foram analisados no software R (IHAKA & GENTLEMAN, 1996) e as médias foram comparadas a partir do teste de SkottKnott a 5% de probabilidade de erro.

3.7 Avaliação da germinação miceliogênica de escleródios

O patógeno *S. sclerotiorum*, previamente mantido em meio BDA durante 7 dias em $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12h, foi repicado para placas de Petri contendo meio BDA, sob as mesmas condições, durante 20 dias para a formação de escleródios (Figura 14a). Posteriormente, os escleródios foram desinfestados em álcool 70% por 60 segundos, hipoclorito de sódio 2% (v/v) durante 60 segundos e em seguida, em água destilada autoclavada (Figura 14b) (MARCUIZZO e SCHULLER, 2014).

Os escleródios desinfestados foram mergulhados durante 10 minutos nos respectivos tratamentos: mix20%, mix autoclavado20%, produto comercial e água destilada autoclavada. Posteriormente, foram acondicionados em placas de Petri com meio Neon (1 L de BDA+ 50mg de azul de bromofenol) e incubados em temperatura de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 12h, para verificar o poder germinativo (Figura 14c) (adaptado de NAPOLEÃO et al., 2006).

As avaliações visuais foram diárias, contabilizando o número de escleródios que germinaram e emitiram hifas. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com 6 repetições, sendo a unidade amostral composta por uma placa com 10 escleródios. Os dados foram submetidos à análise de sobrevivência por meio do cálculo da curva de sobrevivência de Kaplan-Meier (1958) (DUDLEY et al., 2016), utilizando a função Survfit do pacote Survival no software R. Foi realizada comparação entre as curvas de sobrevivência através do teste G-rho (logrank test) (IHAKA & GENTLEMAN, 1996).

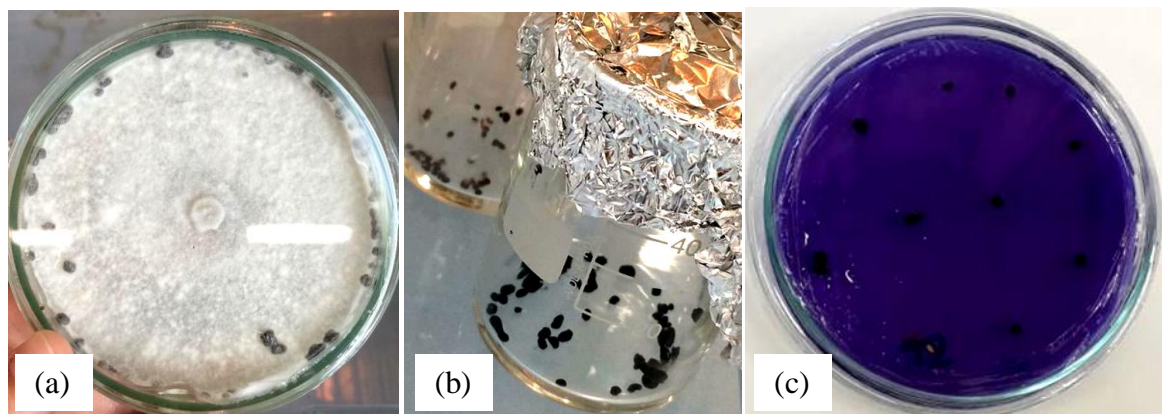


Figura 14 - (a) Placa com *Sclerotinia sclerotiorum* de 20 dias de incubação e escleródios; (b) escleródios desinfestados prontos para serem tratados; (c) Placa de Petri com meio BDA+azul de bromofenol e escleródios tratados. Fonte: a autora

3.8 Avaliação de enzimas relacionadas à patogênese

3.8.1 Aplicação dos tratamentos e coleta

As sementes de tomateiro, cultivar de Micro-Tom, foram semeadas e transplantadas 22 dias após a semeadura (DAS) em vasos de 500 mL contendo solo:areia:substrato MecPlant® (1:1:2). A adubação foi realizada com NPK (1 g de NPK 10.10.10 por litro de substrato).

A aplicação dos tratamentos (mix 20% e mix autoclavado 20% de PKM16, água destilada autoclavada e produto comercial biológico a base de *Bacillus subtilis*) ocorreu quando as plantas apresentavam 5 folhas verdadeiras (29 DAS). A inoculação do patógeno *S. sclerotiorum*, foi realizada 48h após a aplicação dos tratamentos pelo método da ponteira.

A coleta para análise enzimática foi realizada durante 7 dias: 0h (antes da aplicação dos tratamentos); 24h; 48h; 72h; 96h; 120h e 144h após a aplicação dos tratamentos. Os procedimentos de coleta foram realizados todos os dias no mesmo horário, pela manhã. Uma folha da respectiva unidade amostral foi retirada (Figura 15), guardada em papel alumínio e em gelo para posterior pesagem em balança analítica de precisão. Logo após, as amostras foram acondicionadas em congelador a -80°C até o momento da extração.



Figura 15 – (a) Coleta da folha da unidade amostral para análise enzimática; (b) Folha pronta para ser armazenada em papel alumínio e gelo. Fonte: a autora

3.8.2 Obtenção do extrato enzimático

Para avaliação, as amostras de aproximadamente 100 mg das plantas foram maceradas em almofariz com nitrogênio líquido e homogeneizadas em 4mL de Tampão Fosfato de potássio TFK 50 mM pH 7.0+ EDTA 0,1 mM e 1% (p/p) de PVP (poli-vinil-pirrolidona). O macerado foi adicionado em microtubos e centrifugado a 14.500 rpm por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para novos microtubos previamente identificados e o precipitado foi descartado (Figura 16) (LUSSO; PASCHOLATI, 1999). As amostras foram então acondicionadas em ultra-frezer a -80°C até o momento de determinação de conteúdo protéico e análise enzimática de peroxidase de guaiacol, catalase, polifenoloxidase, β -1,3 glucanase e fenilalanina amônia liase.

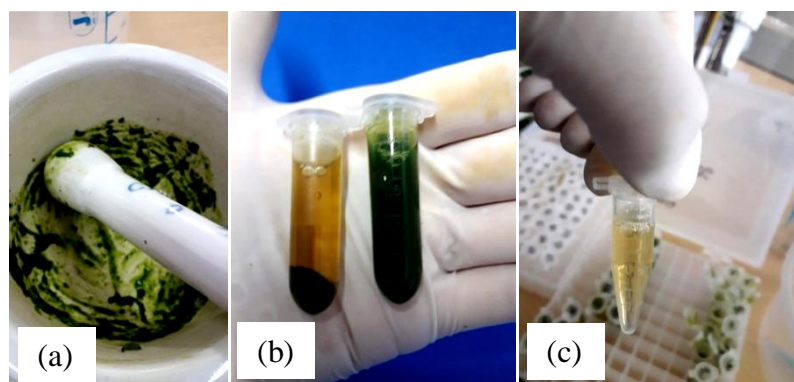


Figura 16 - Obtenção do extrato enzimático: (a) Folhas maceradas em almofariz; (b) Microtubos contendo o extrato enzimático bruto após maceração e microtubos com extrato enzimático após centrifugação; (c) Microtubos com o sobrenadante do extrato sendo armazenados. Fonte: a autora

3.8.3 Análises bioquímicas

3.7.3.1 Proteínas totais

Para a análise das proteínas totais da amostra, foi utilizado o método de Bradford (1976) que quantifica a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante Comassie Brilliant Blue (BG-250). Em tubos de ensaio foram adicionados 50 μL de extrato enzimático e 2,5 mL de Bradford e homogeneizados em vórtex. Além da amostra, foi preparado o branco, adicionando-se 50 μL de extrato enzimático e 2,5 mL de Bradford. Após 5 minutos em temperatura ambiente, tempo necessário para ocorrer a reação, foi realizada a leitura em espectrofotômetro com cubeta de vidro, em comprimento de onda de 595 nm. Os resultados foram de absorbância (ABS).

Para a determinação da concentração de proteínas em cada amostra, expressa em miligrama de proteína por mL de amostra ($\text{mg proteína.mL}^{-1}$), foi determinada a curva padrão de proteínas $y = 0,035x + 0,062$ ($R^2 = 0,991$), onde y é ABS a 595nm e x é a concentração de proteína para cada 0.5 mg.mL^{-1} de albumina de soro bovino (Figura 17). A partir desta curva, os valores de proteína foram inferidos.



Figura 17 - Preparo das concentrações para a determinação da curva padrão de proteínas.
Fonte: a autora

3.7.3.2 Atividade de peroxidase de guaiacol (POD) (E C 1.11.1.7)

A atividade da peroxidase foi determinada a partir do método espectrofotométrico direto, proposto por Lusso e Pascholati (1999). Neste método mede-se a conversão de guaiacol em tetraguaiacol. Em uma cubeta de vidro foi adicionado 100 μL do extrato

enzimático e 2,9 mL de substrato para enzima. O substrato foi composto de tampão fosfato de potássio 0,01M pH 6,0, peróxido de hidrogênio e guaiacol 2%, onde para cada 100mL de substrato utilizava-se 99,444 mL, 306 µL e 250 µL respectivamente. O Becker com o substrato foi levado ao agitador magnético por 30 segundos e, posteriormente, ao banho-maria a 30 °C por 30 min e durante as leituras.

Após a adição de extrato e substrato na cubeta, iniciou-se a reação, por um período de 2 minutos. A atividade foi determinada pela variação entre os valores extremos localizados na faixa de incremento linear e expressa em variação de absorbância por minuto por miligrama de proteína ($\Delta\text{ABS} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$).

3.7.3.3 Atividade de catalase (CAT) (E C 1.11.1.6)

A atividade da catalase foi determinada utilizando a metodologia de Goth (1991), modificado por Tománková et al. (2006), sendo determinada pelo complexo estável formado por molibdato de amônio com peróxido de hidrogênio. Para tanto, foi preparado uma solução de molibdato 32,4 mM (4 g de molibdato para cada 100mL de água destilada) e um substrato para reação (99,35mL de TFK 60 mM pH 7,4 e 650 µL de peróxido de hidrogênio - H_2O_2) que foi acondicionado em banho-maria a 38 °C.

A atividade da enzima foi obtida pela diferença entre amostra e o controle. Para determinação da amostra, 100 µL do extrato enzimático e 500 µL de substrato para enzima foram adicionados em tubos de ensaio, que reagiram por 4 minutos em banho-maria a 38 °C. Para paralisar a reação de consumo de peróxido de hidrogênio, foi adicionado 500 µL de solução de molibdato. As leituras do complexo amarelo formado por molibdato e peróxido de hidrogênio foram realizadas em espectrofotômetro, com cubeta de quartzo, em comprimento de onda de 405nm.

A determinação do controle consistiu em análise direta em espectrofotômetro (405nm) com cubeta de quartzo, de 100 µL de extrato enzimático, 500 µL de solução de molibdato e 500 µL de substrato para enzima. A concentração de H_2O_2 , foi determinada utilizando-se o coeficiente de extinção $\epsilon = 0,0655 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, sendo por fim expressa em micromol por minuto por miligrama de proteína ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$).

3.7.3.4 Atividade de polifenoloxidase (PPO) (E C 1.10.3.2)

A partir da metodologia de Duangmal e Apenten (1999), foi determinada a atividade da enzima polifenoloxidase, a partir da quantificação da reação mediada por esta, que é a oxidação do catecol convertido em quinona. Para o preparo do substrato para enzima, em um Becker envolto por papel alumínio foi adicionado 20 mL de tampão fosfato de potássio 0.1M pH 6,8 e 0,04404 g de catecol. Depois de homogeneizado foi levado ao banho-maria a 30 °C.

Em uma cubeta de quartzo foi adicionado 100 µL da amostra enzimática e 900 µL de substrato para enzima. A leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 420 nm, a cada 10 segundos por 2 minutos. A atividade da enzima foi determinada a partir da variação entre o valor máximo e mínimo no intervalo onde os incrementos de atividade foram lineares e foi expressa em variação de absorbância por minuto por miligrama de proteína ($\Delta\text{ABS} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$).

3.7.3.5 Atividade de β -1,3 glucanase (GLU) (E C 3.2.1.6)

A atividade da enzima β -1,3 glucanase foi determinada através da quantificação colorimétrica de açúcares redutores liberados a partir da reação da enzima com a laminarina e da hidrazida do ácido p -hidroxibenzóico (PAHBAH) (VOGELSANG e BRAZ, 1993). Para o preparo da amostra foi adicionado 150 µL do extrato enzimático e 150 µL de laminarina (1,5 mg. mL⁻¹) em tubos de ensaio. Estes tubos foram submetidos ao banho-maria por 1 h a 40 °C para a ocorrência da reação entre a enzima e a laminarina. Para o controle foi realizado o mesmo processo, porém com a adição da laminarina somente após a incubação em 40 °C por 1h.

Posteriormente, os açúcares redutores foram quantificados pelo método de Lever (1972), onde 30 µL da solução foram transferidos a novos tubos, adicionados 1,5 mL ácido p -hidroxibenzóico PAHBAH (0,5 g de 4- Hydroxybenhydrazide diluída em 20 mL de HCl 0,5 M, com adição de 80 mL de NaOH 0,5M) e incubados em banho-maria por 5 min a 100°C, onde ocorre a reação entre PAHBAH e açúcares liberados a partir da suposta ação enzimática. Os tubos foram então submetidos a um banho de gelo.

A leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 410 nm em cubeta de vidro. A atividade da enzima foi aferida a partir da diferença entre as absorbâncias da amostra e do controle, menos a absorbância do branco (laminarina e tampão de extração).

A diferença das leituras de absorvância foram plotadas em curva padrão para a glicose $y = 0.1685x + 0.0984$ ($R^2=0.9908$), onde y é a absorvância a 410 nm e x é a concentração de açúcares redutores e o resultado foi expresso em microgramas de glicose por miligrama de proteína ($\mu\text{g glicose.mg proteína}^{-1}$).

3.7.3.6 Fenilalanina amônia liase (PAL) (EC 4.3.1.5)

A atividade da enzima foi determinada medindo a produção de ácido trans-cinâmico da L-fenilalanina, seguindo metodologia proposta por Umesha, (2006). Em um Becker, posteriormente tampado com papel alumínio, foi dissolvido 0,2065 g de L-Phenilalanine em 25 mL água estilada, para o preparo do substrato. Para o preparo da amostra, foi adicionado em tubos de ensaio 100 μL de extrato enzimático, 400 μL de tampão Tris-HCl 25 mM (pH 8,8) e 500 μL de substrato. Nos tubos correspondentes ao branco foi adicionado 500 μL de tampão Tris-HCl 25 mM (pH 8,8) e 500 μL de substrato. Já no controle, não foi adicionado o substrato, apenas 100 μL de extrato e 900 μL de tampão Tris-HCl 25 mM (pH 8,8).

Os tubos foram acondicionados em banho-maria a 40°C por 1 hora e em banho de gelo, com posterior adição de 60 μL de HCl (5 M) para paralisação da reação. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 290 nm em cubeta de quartzo. A leitura real deu-se pela subtração do branco. O resultado de absorvância final deu-se pela subtração da leitura real do controle da leitura real da amostra. Este por sua vez foi submetido à equação da curva do ácidotrans-cinâmico ($y = 4,660x + 0,025$ $R^2=0.996$) e o resultado final foi expresso em mg de ácido trans-cinâmico por mg de Proteínas ($\text{mg ác trans.mg proteína}^{-1}$).

3.8.4 Análise estatísticos dados

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial [(4x6)+1], constituídos pelos tratamentos água, mix, mix autoclavado e produto comercial com as diferentes horas de coleta 24h, 48h+inoculação, 72h, 96h, 120h e 144h e um tratamento adicional referente à coleta sem a aplicação dos tratamentos. Foram realizadas 7 repetições, sendo a unidade amostral composta por uma planta. As enzimas foram avaliadas em duplicata. Os dados foram analisados no software R (IHAKA & GENTLEMAN, 1996), as médias foram comparadas a partir do teste de SkottKnott e a média do tratamento adicional

comparada com a média dos demais tratamentos a partir do teste de Dunnett, a 5% de probabilidade de erro.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Confronto direto e compostos voláteis

Os isolados de rizobactérias, nas condições do presente estudo, não produziram compostos voláteis com potencial inibitório do crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, pois a área abaixo da curva do crescimento micelial (AACCM) foi igual à testemunha, a qual não havia a rizobactéria (Tabela 1).

Em relação ao confronto direto, dois isolados promoveram a inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum*. RB1 e RB2 diferiram da testemunha e entre si, com AACCM de 9,50 e 12,21 respectivamente. A partir da AACCM, observa-se que o isolado RB3 se igualou à testemunha com 14,04, não apresentando capacidade inibitória contra o fungo *S. sclerotiorum*. Da mesma forma, o halo de inibição foi significativamente inferior aos demais isolados, sendo quase nulo e PIC inferior a 10% (Tabela 1).

O melhor isolado foi RB1 com 40,27% de inibição do crescimento *in vitro* do fitopatógeno (Tabela 1). Também observa-se tal comportamento na Figura 18a, que mostra o crescimento micelial final (cm) do fitopatógeno quando confrontado com as rizobactérias. Além disso, o halo gerado por este isolado é permanente, ou seja, as placas permaneceram em BOD durante 1 ano, o meio de cultura secou e o halo permaneceu (Figura 18b).

Tabela 1. Área abaixo da curva do crescimento micelial (AACCM) do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* em meio BDA submetidos a três isolados de rizobactérias nos testes de confronto direto e compostos voláteis.

	Compostos voláteis	Confronto direto	
	AACCM	AACCM	ICM
RB1	4,55 ^{ns}	9,5 a	40,27
RB2	5,95 ^{ns}	12,21 b	25,97
RB3	5,50 ^{ns}	14,04 c	9,38
TEST.	5,20 ^{ns}	15,23 c	-
CV %	18,56	11,38	

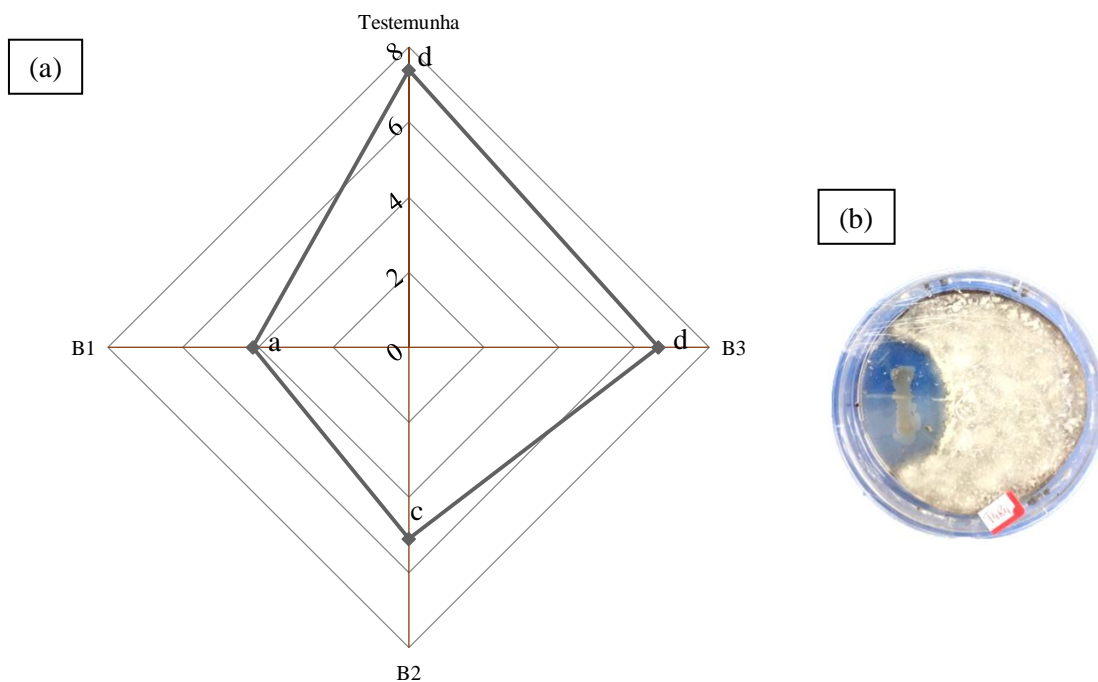


Figura 18 - Crescimento do fitopatôgeno *Sclerotinia sclerotiorum* (cm) na presença de três isolados de rizobactérias. Letras iguais não diferem entre si de acordo com o teste de SkottKnott ($p < 0,05$) CV: 10,65; (b) Halo de inibição permanente do isolado.

A partir da análise das características de crescimento e morfologia das células e colônia e pela coloração de Gram foi possível identificar que os isolados RB1 e RB2 pertencem ao gênero *Bacillus*. As células apresentam forma de bastonetes alongados, são gram positivas, colônia branca, mucóide e rugosa, de bordas irregulares. As células se multiplicavam rapidamente em meio líquido CN (RABINOVITCH e OLIVEIRA, 2015). O isolado RB3 apresenta características distintas de morfologia, como colônia branca não mucóide, de crescimento lento e células do tipo cocus, possivelmente pertencendo a outro gênero de bactérias habitantes do solo.

As rizobactérias podem atuar de diferentes formas sobre a inibição do patógeno, podendo competir por recursos no meio, produção de compostos antimicrobianos solúveis ou por emissão de compostos voláteis antimicrobianos (VINODKUMAR et al., 2017; GUEVARA-AVENDAÑO et al., 2018). Há pesquisas que mostram a produção de compostos voláteis por rizobactérias de caráter antimicrobiano (GAO et al., 2017; MENDEZ-BRAVO et al., 2018; GUEVARA-AVENDAÑO, 2019), inclusive no controle *in vitro* de *S.sclerotiorum* (GIORGIO et al., 2015). Porém, como já ressaltado por Mariano (1993), a sensibilidade de resposta dos testes e ensaios pode diferir a partir das diferentes metodologias e variáveis, bem

como dos diferentes isolados de fitopatogenose dos isolados antagonistas. Braga Junior et al. (2017), averiguaram diferentes respostas de atividade antagônica *in vitro* de *Bacillus subtilis* sobre *Fusarium subglutinans*, *Curvularia lunata* e *Bipolaris* sp. a partir de testes com quatro metodologias diferentes. Em determinadas metodologias houve inibição de crescimento micelial por metabólitos voláteis e/ou por metabólitos termoestáveis e em outras não.

Em trabalhos realizados por Vieira et al. (2016), que testaram o antagonismo de *Bacillus subtilis* (BSV-05) contra *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*, *Macrophomina phaseolina* e *Rhizoctonia solani*, observaram-se que o isolado bacteriano BSV-05 não produziu nenhum metabólito volátil. Michereff (1994), testando isolados de *B.subtilis* contra *Colletotrichum graminicola*, observaram que os metabólitos produzidos pelas bactérias eram antagônicos aos fitopatógenos, termoestáveis, difusíveis e não-voláteis. Dessa forma, observa-se que diferentes isolados de *Bacillus* spp. apresentam capacidade de produzir metabólitos com propriedades e modos de ação diferentes.

Em relação aos antibióticos solúveis, estes solubilizam-se no meio de cultura e entram em contato com o patógeno causando antagonismo. Os lipopeptídeos são um exemplo destes compostos. Diversos tipos de LPs são produzidos e em diferentes concentrações, dependendo do isolado de rizobactéria, bem como do patógeno com o qual é confrontado (YARZABAL e CHICA, 2019). Em trabalho realizado por Li et al. (2015), diferentes cepas de *B. amyloliquefaciens* apresentaram diferentes produções de lipopeptídicos antagonistas em confrontos com diferentes patógenos.

De acordo com inúmeros estudos *in vitro* (CHOWDHURY et al, 2015), a atividade antifúngica de algumas espécies de *Bacillus*, como *B. amyloliquefaciens* é devido à síntese não ribossomal dos lipopeptídeos bacilomicina D, fengicina e surfactina. A bacilomicina D apresenta forte atividade antifúngica e trabalhos já evidenciaram a sua atividade *in vitro* contra patógenos do gênero *Fusarium* (XU et al., 2013; LI et al., 2015). Da mesma forma, Li et al., (2014), evidenciaram a participação da surfactina no processo antagônico contra *S. sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* e *Fusarium solani*; e da fengicina contra *Verticillium dahliae* kleb, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* e *Phytophthora parasítica* quando confrontados com *B. amyloliquefaciens* SQR9.

O controle observado por parte das rizobactérias também pode ser atribuído à possível atividade de enzimas hidrolíticas que degradam a parede celular de outros microrganismos. Em trabalho realizado por Rocha e Moura (2013), os autores averiguaram que rizobactérias do gênero *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp. e *Streptomyces* produziam enzimas relacionados à

antibiose *in vitro* contra *Ralstonia solanacearum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Alguns isolados do gênero *Bacillus* produziram quitinase, lipase e apresentaram capacidade de solubilizar fosfato de cálcio. Segundo Agrios (2004), a parede celular de fungos é composta principalmente por quitina, logo, um biocontrolador capaz de produzir quitinase, enzima que hidrolisa a quitina, tem grande potencial de controle.

A partir dos testes *in vitro*, verificou-se a capacidade fungitóxicas destes isolados, em especial o RB1, sobre o *S. sclerotiorum*. Tais biocontroladores podem agir principalmente por antagonismo direto contra o patógeno, todavia, diversos estudos vêm avaliando seu potencial como indutores de resistência em plantas (BERNARDES et al., 2010, CHOWDHURY et al., 2015, HUANG et al., 2016; SINGH et al., 2016).

4.2 Determinação da concentração do mix e do mix autoclavado

O melhor isolado (RB1) em relação ao antagonismo *in vitro* à *S. sclerotiorum* foi sequenciado e identificado como *B. amyloliquefaciens* strain PKM16 (PKM16). No teste *in vitro* de melhor concentração, o tratamento mix de PKM16 inibiu completamente o desenvolvimento do patógeno em todas as doses testadas. Já em relação ao mix autoclavado, houve inibição apenas a partir da dose de 30%, sendo a dose de 50% a que apresentou menor AACPD e maior PIC, de 8 e 32%, respectivamente (Figura 19).

Para a espécie *B. amyloliquefaciens* 8,5% do genoma (~340 kb) está relacionado com a síntese de metabólitos secundários. Dentre os metabólitos produzidos destacam-se os lipopeptídeos surfactina, inturina, bacilomicina D e fengicina; os policetídeos macrolactina e bacilaene; compostos voláteis como a acetoina; e enzimas hidrolíticas como celulase, amilase, protease e quitinase, os quais podem estar diretamente ligados à inibição do crescimento de fitopatógenos e/ou na atuação como elicitores na indução de mecanismos de resistência da planta (CHEN et al., 2009).

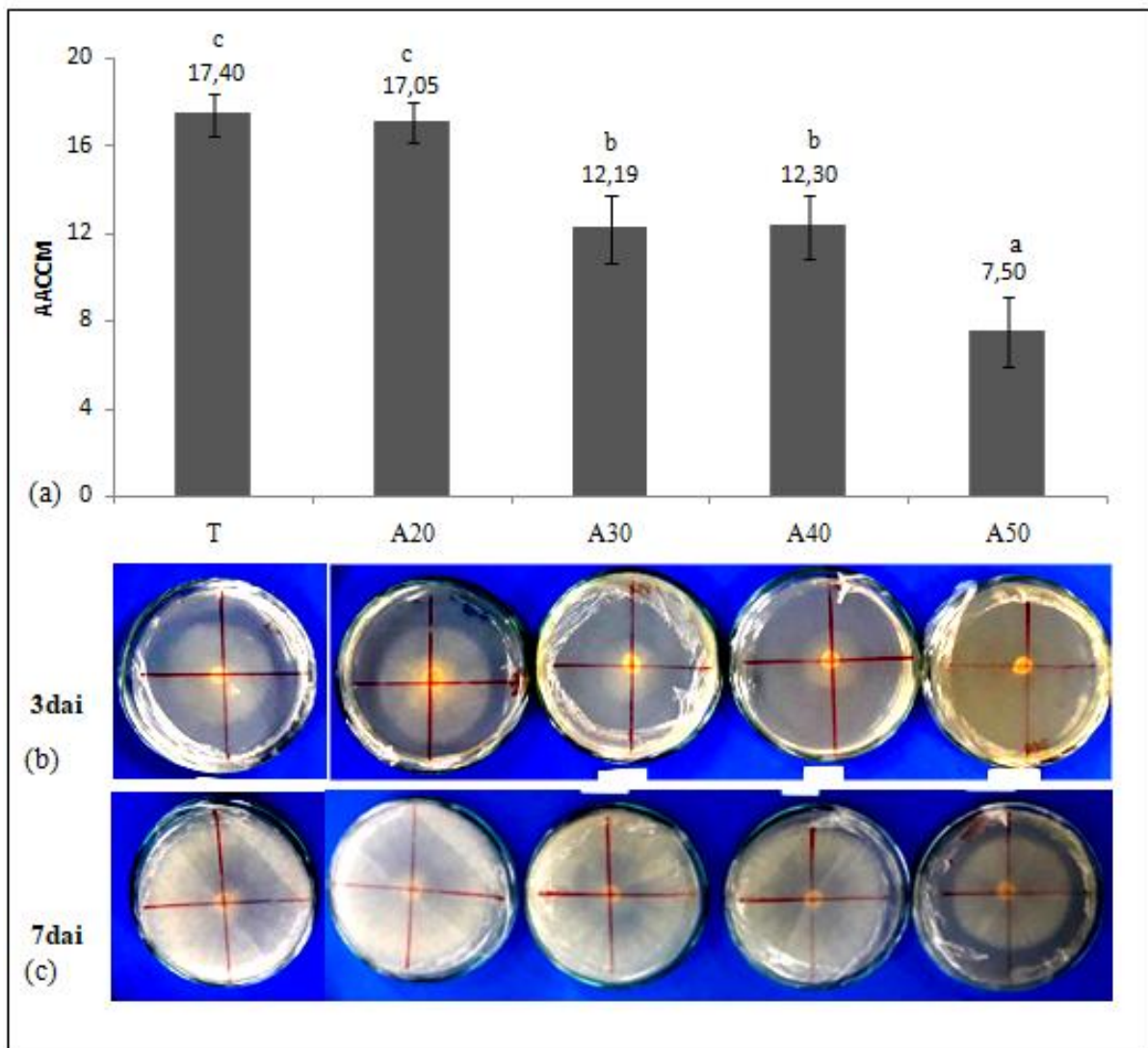


Figura 19 – (a) Área abaixo da curva do crescimento micelial (AACCM) do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* em meio BDA (*in vitro*) na presença de diferentes concentrações de mix autoclavado (células lisadas e metabólitos) de *Bacillus amyloliquefaciens* cepa PKM16; (b) Placas de Petri com *Sclerotinia sclerotiorum* na presença de diferentes tratamentos aos 3 dias após incubação e (c) 7 dias após incubação. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de ScottKnott ($p < 0,05$). CV (%): 19,73.

O efeito do tratamento com o mix autoclavado e do tratamento com o mix nas diferentes concentrações, foi diferente sobre o crescimento micelial de *S. sclerotiorum*. Dentre todos os prováveis compostos de caráter antimicrobiano produzidos pelo isolado *B. amyloliquefaciens* PKM16, alguns possivelmente possuem característica termolábil, ou seja, não suportaram a autoclavagem (121°C, 1 atm por 25 min). Dessa forma, uma parte destes compostos pode ter sido degradada, restando uma menor concentração, ou restando apenas os

compostos com ação não tão efetiva sobre o patógeno. Outra justificativa para o fato de o tratamento mix ter sido melhor que o mix autoclavado é a união do fator antibiose com competição por recursos, visto que as células vivas bacterianas de *B. amyloliquefaciens*, não presentes no mix autoclavado, podem ter competido por nutrientes e espaço do meio com *S. sclerotiorum*.

Em trabalhos realizados por Furlani et al. (2007), foi possível verificar que o tratamento com o mix autoclavado de *Bacillus* spp. não apresentou atividade antagonista *in vitro* contra *Colletotrichum acutatum*, mas que o filtrado de cultura bacteriana foi altamente eficiente para inibir o crescimento micelial do fungo. Neste caso, como a solução foi filtrada, não havia células para o efeito de competição de recursos, apenas metabólitos produzidos. Logo, os metabólitos antagonistas eram totalmente termolábeis.

Com relação ao fator concentração do caldo, resultados semelhantes foram encontrados por Gomes et al., (2001), em teste *in vitro* com caldo de *B. subtilis* autoclavado e não autoclavado nas concentrações de 10%; 50% e 100% na germinação de conídios de *Cylindrocladium spathulatum*. Esses autores averiguaram inibição maior nas concentrações de 50 e 100 %, diferente do encontrado no presente trabalho com *B. amyloliquefaciens*, onde 20% de mix já foi suficiente para inibição total. Da mesma forma, Gomes et al., (2001) também observaram que o caldo sem autoclavagem causou maior inibição na germinação de conídios de *C. spathulatum*. Venturini et al.(2014), mostraram que a concentração de 10% de caldo autoclavado de um isolado de *B.subtilis* já é suficiente para inibição do crescimento micelial de *Thielaviopsis paradoxa*.

Os resultados obtidos *in vitro* mostraram que o *B. amyloliquefaciens* PKM16 foi eficiente na inibição do crescimento de *S.sclerotiorum*. Mesmo sendo um teste importante em análises primárias, o teste *in vivo* é essencial para a escolha da melhor concentração, visto que há a interação patógeno-hospedeiro, além de variáveis não controladas como temperatura e umidade (AMORIM et al., 2018).

No teste *in vivo*, a testemunha apresentou AACPD de 16. O mix de *B. amyloliquefaciens* foi diferente da testemunha em todas as doses testadas, as quais não diferiram entre si, com média de AACPD e PIC de 11 e 32%, respectivamente. Já em relação ao mix autoclavado, foi possível observar que a AACPD diminuiu apenas nas doses de 20 e 30%, com AACPD de 12 e 9 e PIC de 33 e 25%, respectivamente, igualando-se aos tratamentos com o mix. Porém houve um incremento no desenvolvimento da doença nas doses de 40 e 50%, não diferindo da testemunha (Figura 20).

No teste *in vivo*, ao contrário do teste *in vitro*, não ocorreu inibição total do patógeno quando a planta foi tratada com mix. Da mesma forma, a resposta dose dependente obtida no teste *in vitro* para o mix autoclavado, também mudou no teste *in vivo*. Logo, ocorreu inibição do patógeno, mas distinta do teste em condições controladas e sem o hospedeiro.

Em trabalho realizado por Maciel et al. (2014), em teste de antagonismo de *B. subtilis* (UFV3918) contra *Fusarium sambucinum* em *Pinus elliottii*, a ação antagonista foi observada nos testes *in vitro* e *in vivo*, porém em intensidades diferentes, sendo inferior no teste *in vivo*. Rocha e Moura (2013), realizaram o mesmo teste em duas épocas diferentes e averiguaram que um isolado de *Bacillus* apresentou eficiência em apenas uma delas, onde as condições de temperatura foram mais amenas e menos favorável para o patógeno. Tal fato comprova a influência dos fatores clima e planta na ação de biocontrole (AMORIM et al., 2018).

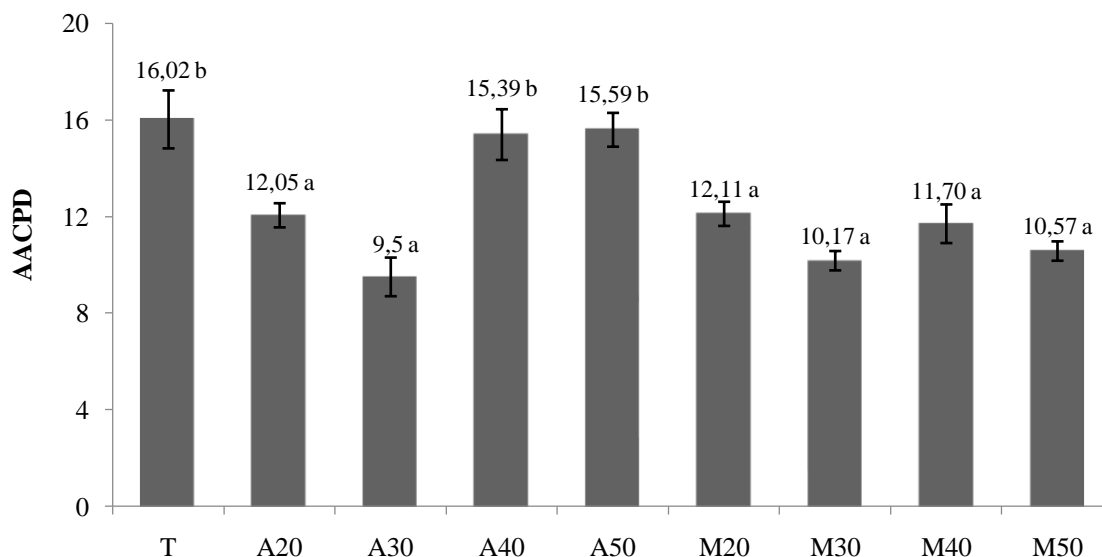


Figura 20 - Área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* em plantas de tomate cv. Micro-Tom (*in vivo*) submetidos às concentrações de 0, 20, 30, 40 e 50% de mix autoclavado (A) e mix (M) de *Bacillus amyloliquefaciens* cepa PKM16. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de ScottKnott ($p < 0,05$). CV (%) 22,51.

A partir dos testes realizados foi possível concluir que a melhor concentração de mix e mix autoclavado é a de 20%. Li et al. (2015), quantificaram *F.oxysporum*, *B.cinerea* e *Alternaria* ssp. na rizosfera do pepino depois de tratadas com 1% e 10% de *B.amyloliquefaciens* LJ02, verificando que 10% foi mais eficiente.

4.3 Efeito residual

As plantas inoculadas com o patógeno 48h depois de serem tratadas apresentaram menor AACPD. Em 48h, os tratamentos mix de PKM16 e o produto comercial foram os que apresentaram melhores resultados, não diferindo entre si e diferindo da testemunha, com PIC médio de 35%. Da mesma forma, o mix autoclavado de PKM16 apresentou menor AACPD nas plantas inoculadas com 48h, diferindo da testemunha. Em 24h o melhor tratamento foi o produto comercial e em 72h o melhor tratamento foi o mix. Houve uma queda no desenvolvimento do patógeno em 96h para todos os tratamentos, porém apenas o mix de PKM16 e o produto comercial diferiram da testemunha. Em 0h e 120h não houve diferença entre os tratamentos (Tabela 2).

Tabela 2 – Área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) causada por *Sclerotinia sclerotiorum*, inoculados em diferentes dias em plantas de tomate cv. Micro-Tom, submetidos a tratamento prévio mix e mix autoclavado de *Bacillus amyloliquefaciens* PKM16 em concentração de 20%, água e produto comercial a base de *Bacillus subtilis*

	Mix autoclavado	Mix	Produto Comercial	Testemunha Água
0h	19,14 Ba	18,80 Ca	17,42 Ca	19,50 Ba
24h	15,67Ab	14,98 Bb	12,93 Aa	16,88Ab
48h	13,88Ab	11,19 Aa	11,36 Aa	17,52 Ac
72h	16,31Ab	13,71 Ba	15,96Bb	17,79Ab
96h	16,31Ab	13,04 Ba	14,56 Ba	16,32Ab
120h	18,65 Ba	19,99 Ca	20,77 Da	20,82 Ba
144h	17,20Ba	20,72 Cb	20,77Db	18,75 Ba
CV		12,66%		

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem entre si nas colunas, médias seguidas de letras minúsculas iguais não diferem entre si nas linhas

Sendo assim, o efeito residual do mix de PKM16 (metabólitos produzidos+células bacterianas) pode ser considerado de 96h onde houve diferença significativa com relação à 0h e também em relação à testemunha. Portanto, nestas condições, o produto deve ser reaplicado a cada 4 dias, para o manejo de *Sclerotinia sclerotiorum* em plantas de tomate Micro-Tom. Com 120h o mix perdeu efeito sobre o controle do mofo branco. Já o efeito residual do mix autoclavado do caldo de PKM16 é de 48h, ou seja, a cada 2 dias o produto deve ser

reaplicado. As condições onde o experimento foi conduzido eram em temperatura e umidade totalmente favoráveis ao patógeno. Logo, acredita-se que o efeito residual poderia ter sido maior, se o experimento tivesse sido conduzido em temperaturas favoráveis à rizobactéria.

Como foi observado, o efeito residual do mix autoclavado foi menor em relação ao mix. A justificativa é a mesma do teste de melhor concentração. A termolabilidade de compostos antagonistas produzidos por *B. amyloliquefaciens* PKM16, ou seja, não suportaram a autoclavagem (121°C, 1atm, 25 min), é uma das justificativas deste resultado. Logo, é possível que a concentração de compostos com potencial antagonista tenha diminuído, ou restado apenas compostos de ação não tão efetiva. O fato das células bacterianas também estarem presentes no mix, também deve ser considerado, destacando-se neste caso o antagonismo pela competição por recursos.

4.4 Germinação miceliogênica de escleródios

Com os resultados obtidos da porcentagem de germinação dos escleródios, foi possível observar que aqueles tratados apenas com água começaram a germinar já no 3º dia de incubação, germinando quase que totalmente no 5º dia (Figura 21a). Os escleródios tratados com mix PKM16 autoclavado germinaram em sua totalidade no 7º dia, porém observa-se que a germinação iniciou-se mais tardiamente em relação à testemunha (Figura 21b) diferindo estatisticamente desta.

Já os tratados com o produto comercial a base de *B. subtilis* apresentaram curva estatisticamente igual ao do mix PKM16 autoclavado, mesmo observando-se uma velocidade de germinação inferior (Figura 21c), ambos diferindo da testemunha. O tratamento mix de PKM16 foi superior aos demais em relação à inibição de germinação de escleródios, pois no 7º dia onde os demais tratamentos já apresentavam germinação total, este mostrava inibição de quase 30% (Figura 21d).

Giorgio et al. (2015) averiguaram que isolados de rizobactérias pertencentes aos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* produziram compostos voláteis com potencial inibitório de germinação de escleródios de *S. sclerotiorum*. Isto demonstra que o gênero apresenta potencial antimicrobiano. Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram a ação antimicrobiana de *B. amyloliquefaciens* cepa PKM16, bem como, de *B. subtilis* (produto comercial) mesmo sendo inferior ao PKM16.

É possível que o tempo de exposição dos escleródios aos tratamentos influencie nos resultados, logo, se aumentado o tempo em que os escleródios foram submersos nos respectivos tratamentos, há a possibilidade de haver acréscimo de inibição.

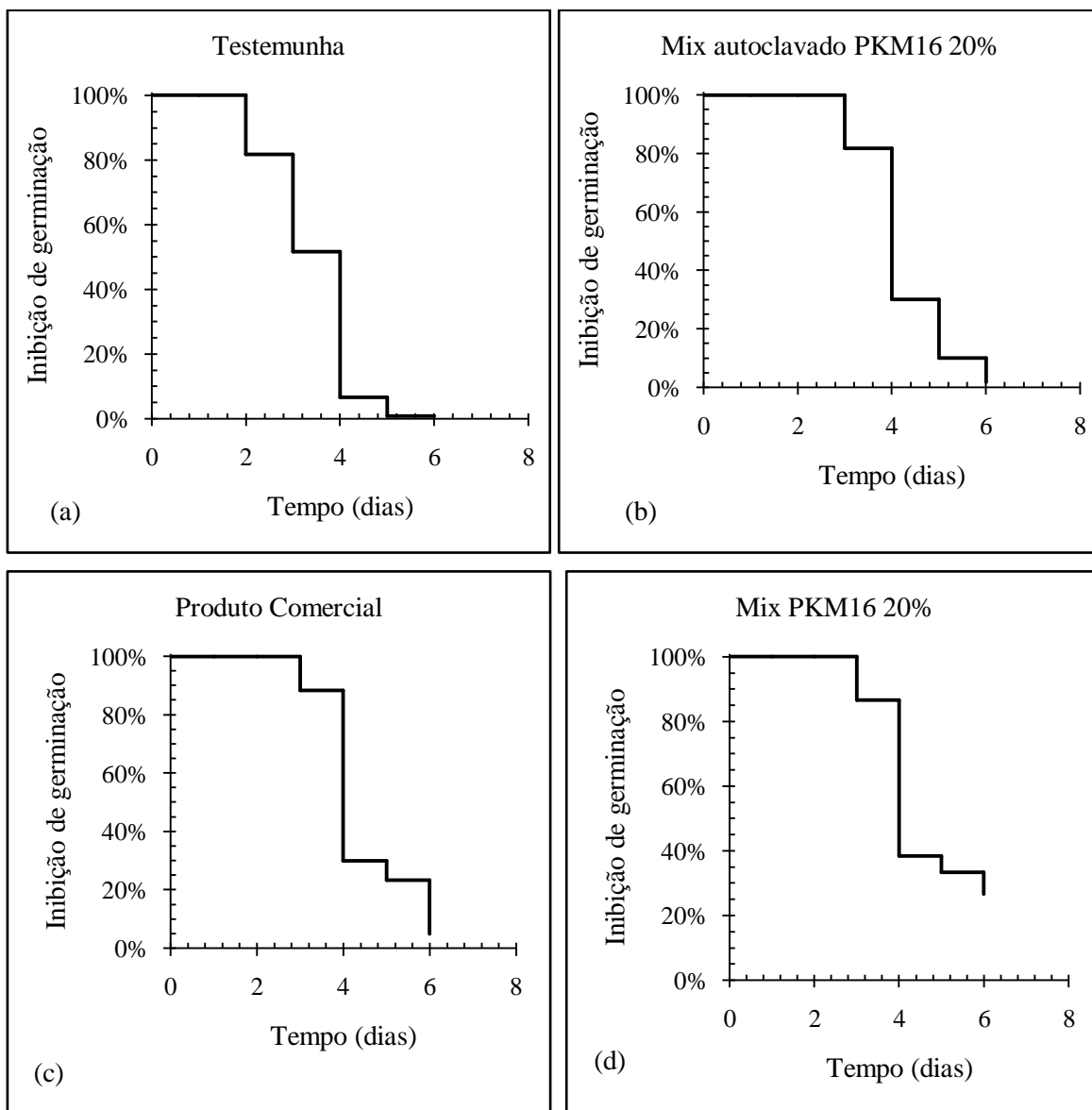


Figura 21 - Inibição de germinação de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* submetidos aos tratamentos (a) água destilada autoclavada, (b) mix autoclavado de PKM16 20%, (c) Produto comercial a base de *Bacillus subtilis* e (d) mix de PKM16 20%

Os escleródios apresentam elevada resistência a fatores ambientais adversos, podendo sobreviver no solo durante anos em condições desfavoráveis e sem hospedeiro (LANE et al., 2019), o que dificulta o controle da doença mofo branco. Dessa forma, o conhecimento do efeito antagonista do isolado *B. amyloliquefaciens* cepa PKM16 na germinação de escleródios

é de suma importância, pois torna o mesmo um possível agente de biocontrole a ser integrado ao controle da referida doença.

4.5 Ativação de enzimas relacionadas à patogênese

As proteínas relacionadas à patogênese são ativadas como mecanismos de defesa da planta por indutores bióticos e abióticos. O fitopatógeno também pode desencadear respostas de defesa quando infectam a planta (PASCHOLATI e DALIO, 2018) e a partir disso as análises bioquímicas foram realizadas em plantas de tomateiro submetidas ao tratamento com *B. amyloliquefaciens* PKM16 e que também foram inoculadas com patógeno *S. sclerotiorum*.

Trabalhos demonstram a eficiência de diferentes cepas de *B. amyloliquefaciens* na indução de genes relacionados à defesa das plantas, bem como em união à inoculação do patógeno. A expressão de genes PR-1 no pepino foi expressiva no segundo e terceiro dia após aplicação de *B. amyloliquefaciens* FJ02 (LI, 2015). Em relação a experimentos onde ocorre a inoculação do patógeno, Huang et al. (2016) avaliaram em plantas de tomate Micro-Tom tratadas com *B. amyloliquefaciens* WF02, expressão acentuada de genes relacionados à patogênese no primeiro dia após inoculação de *Ralstonia solanacearum*.

4.5.1 Atividade de Peroxidase de guaiacol (POD)

A atividade da enzima foi expressiva nas 48h após a inoculação do patógeno (96h após a aplicação dos tratamentos - AAT), onde o mix autoclavado foi o melhor tratamento, seguido pelos tratamentos com água, produto comercial e mix. Nesse período iniciou-se o processo de colonização do fungo. Em 96h após a inoculação do patógeno (144h AAT), a atividade da enzima foi maior, onde o produto comercial apresentou melhores resultados, seguido por mix autoclavado e água, e por fim o mix (Figura 22). Como a testemunha também apresentou comportamento semelhante, acredita-se que a atividade da enzima está relacionada com a colonização do patógeno (AMORIM e PASCHOLATI, 2018).

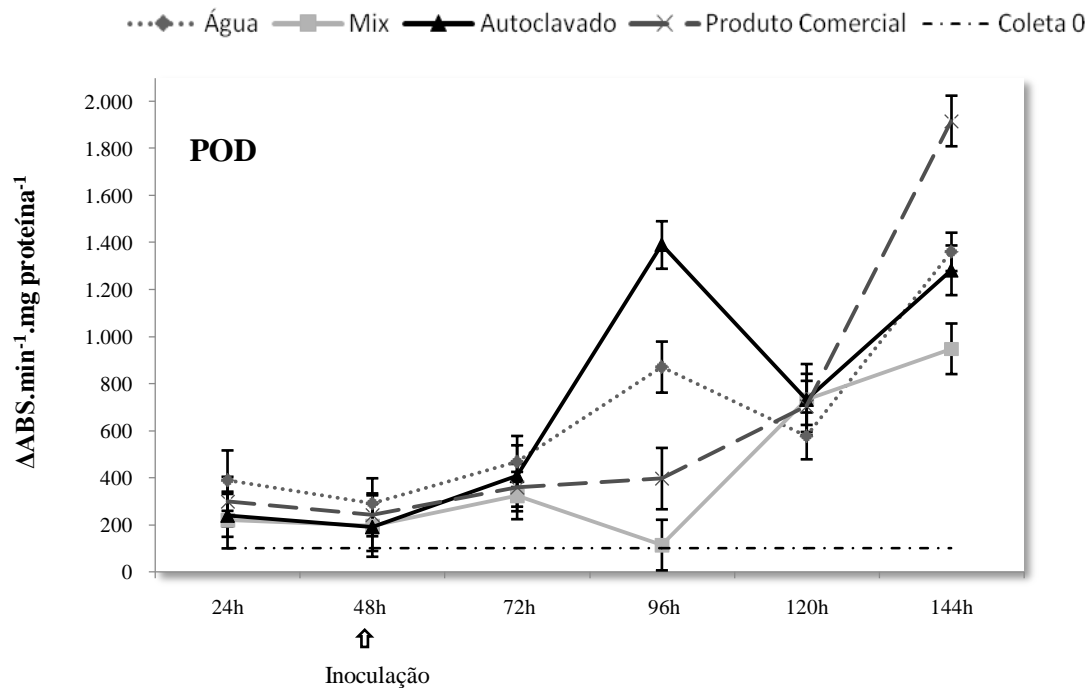


Figura 22 - Atividade da enzima Peroxidase de guaiacol – POD ($\Delta\text{ABS} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg} \text{ proteína}^{-1}$) em plantas de tomate Micro-Tom as 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas após a aplicação dos tratamentos (AAT) mix 20% e mix autoclavado 20% de *Bacillus amyloliquefaciens* PKM16, produto comercial e água destilada autoclavada; e com inoculação de *Sclerotiniasclerotiorum* em 48h AAT. Barras referem-se ao desvio padrão da média.

4.5.2 Atividade de Catalase (CAT)

A atividade da enzima começou a crescer a partir da inoculação do patógeno. Com 24h após a inoculação (72h AAT), a atividade aumentou consideravelmente nas plantas tratadas com produto comercial, mix e mix autoclavado. Porém, a maior atividade da enzima foi observada nas plantas tratadas pelo produto comercial, seguido pelo mix autoclavado de PKM16 com 96h após inoculação do patógeno (144h AAT) (Figura 23).

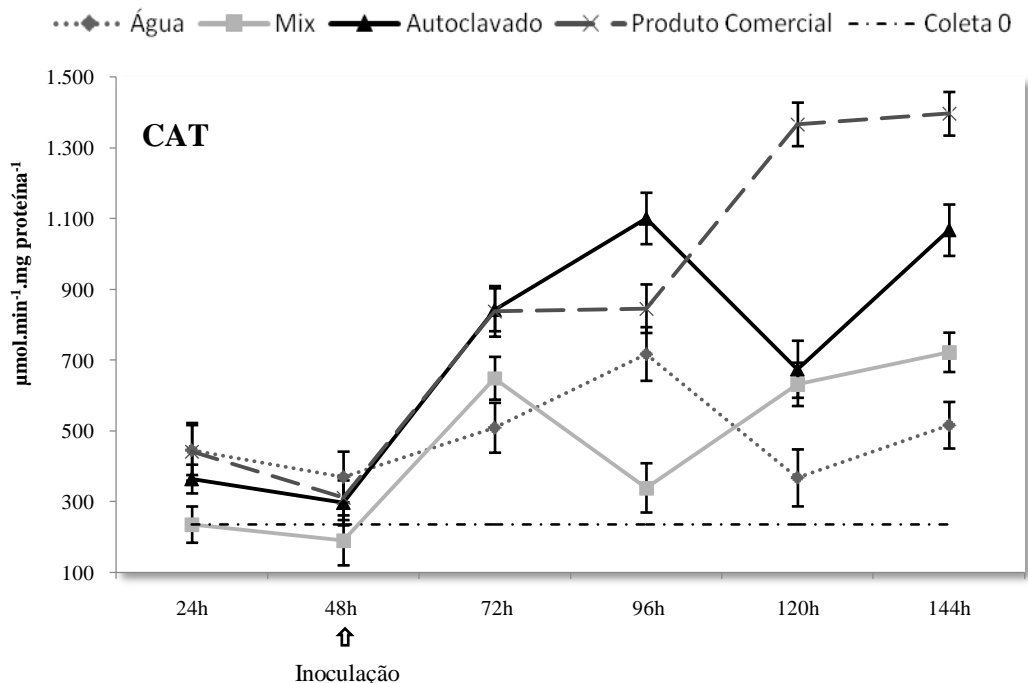


Figura 23 - Atividade da enzima Catalase – CAT ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg} \text{ proteína}^{-1}$) em plantas de tomate Micro-Tom as 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas após a aplicação dos tratamentos (AAT) mix 20% e mix autoclavado 20% de *Bacillus amyloliquefaciens* PKM16, produto comercial e água destilada autoclavada; e com inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum* em 48h AAT. Barras referem-se ao desvio padrão da média.

Ambas as enzimas CAT e POD apresentaram pico nas 96h após a inoculação do patógeno (144h AAT), período em que o processo de colonização do fungo está ocorrendo. Desta maneira, onde o fungo desenvolveu-se mais rápido, observa-se o pico da produção destas enzimas. Os tratamentos induziram a atividade de CAT e POD, mas seu efeito foi diluído pela influência do patógeno que é extremamente agressivo, principalmente acometendo plantas de tomate Micro-Tom, que é rapidamente tomado pela doença em condições normais.

O fungo *S. sclerotiorum* é um patógeno extremamente agressivo, que produz enzimas que degradam a parede celular das células vegetais (JACCOUD FILHO et al., 2017; PASCHOLATI e DALIO, 2018). A ação deste patógeno nas plantas de tomates Micro-Tom, advinda da inoculação 48h após a aplicação dos tratamentos, causa estresse biótico severo às plantas. As respostas bioquímicas da planta podem ser ativadas em função à exposição ao estresse, as quais envolvem a expressiva biossíntese de espécies reativas de oxigênio, como o H_2O_2 , que causam danos oxidativos em proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. Este fenômeno é chamado de estresse oxidativo (STANGARLIN et al., 2011; BARBOSA et al., 2014). Marek (2018) observou em plantas de tomateiro tratadas com estrobilurinas e carboxamidas,

que o aumento significativo da produção de espécies reativas de oxigênio (O_2^-) ocorreu em função do início do desenvolvimento da doença pinta preta, causado por *A.solani*.

Para combater o estresse oxidativo causado pelas EROs, as plantas utilizam seus sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos para desintoxicar as células (BARBOSA et al., 2014; RECZEK e CHANDEL, 2015). Segundo Sharma et al. (2012), o estresse causado por fitopatógenos tem como primeira resposta a explosão oxidativa. Em consequência, ocorre o aumento na atividade de enzimas como a catalase e peroxidase, responsáveis pela antioxição. Marek (2018) também observou que a atividade da POD foi influenciada pela presença do patógeno *A.solani* no tomateiro.

A enzima peroxidase oxida material orgânico através da eliminação do peróxido de hidrogênio no citosol e cloroplastos, utilizando os compostos fenólicos como doadores de elétrons (BAYSAL et al., 2003; LOCATO et al., 2010). O aumento da atividade de POD a partir do 3º dia da aplicação de tratamentos também foi observado por Li et al. (2015), onde averiguaram atividade máxima no 7º dia, provavelmente devido a produção em excesso de H_2O_2 .

Da mesma forma, a enzima catalase (CAT) também reduz o excesso de EROs, detoxificando o H_2O_2 e convertendo-os em oxigênio (O_2) e água (H_2O). A atividade da CAT é evidente e eficaz, principalmente em altas concentrações de H_2O_2 , logo, é uma importante enzima em condições de estresse severo (SEDLAROVA et al., 2007; DUBEY, 2010).

O fungo *S. sclerotiorum* secreta ácido oxálico, um ácido di-carboxílico que facilita a colonização do fungo, pois induz a morte celular no hospedeiro e regula a expressão de EROS. No início da infecção, essa substância mantém a expressão de EROS estável, para que a planta não reconheça o fungo e então seja bem sucedido na colonização. Nas fases posteriores a infecção, a indução de EROs e apoptose celular do hospedeiro são críticas (KABBAGE et al., 2015).

As EROs apresentam funções biológicas distintas dependendo da sua concentração no hospedeiro. Quando estão presentes em altas concentrações, causam sérios danos aos componentes celulares, mas em baixas concentrações atuam como sinalizadores bioquímicos para a cascata de sinais e ativação de genes de defesa (SHARMA et al., 2012).

4.5.3 Atividade de Fenil alanina amônia-liase (PAL)

O pico de atividade de PAL ocorreu na planta testemunha, seguido pelos tratamentos com mix autoclavado de PKM16, em 96h após a inoculação (144h AAT). Apesar deste pico, provavelmente por interferência do patógeno, os tratamentos de PKM16 foram expressivos na indução da PAL no 3º dia após a aplicação dos tratamentos (Figura 24). Li et al. (2015) verificaram que plantas de pepino tratadas com *B. amyloliquefaciens* LJ02 apresentaram incremento de atividade de PAL no 3º dia, onde as tratadas foram significativamente maiores que a testemunha.

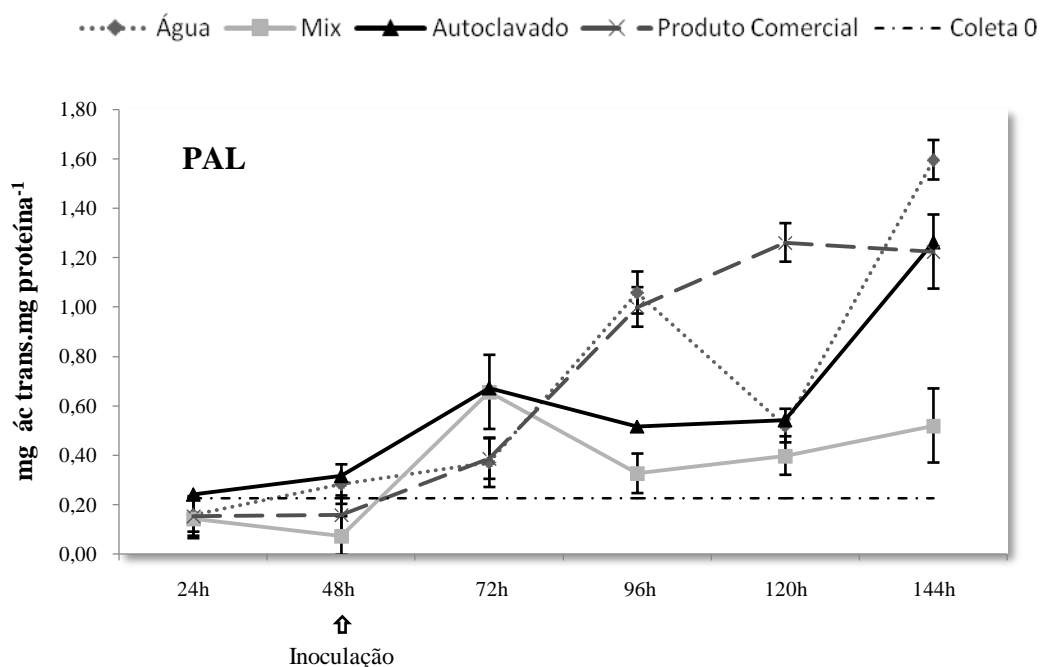


Figura 24 - Atividade da enzima Fenilalanina amônia-liase – PAL ($\text{mg ácido trans.mg proteína}^{-1}$) em plantas de tomate Micro-Tom as 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas após a aplicação dos tratamentos (AAT) mix 20% e mix autoclavado 20% de *Bacillus amyloliquefaciens* PKM16, produto comercial e água destilada autoclavada; e com inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum* em 48h AAT. Barras referem-se ao desvio padrão da média.

Observa-se que da mesma forma que POD e CAT, a PAL foi fortemente influenciada pela colonização do patógeno. Marek (2018) observou que a atividade de PAL aumentou em resposta ao estresse causado pela infecção do patógeno nas testemunhas. Huang et al. (2016) testou inoculação de *R. solanacearum* em tomates tratados com *B. amyloliquefaciens* WF02 e averigou atividade expressiva de PAL no 3º dia após inoculação do patógeno, onde observa-se, no presente trabalho, um pico da expressão da enzima com a testemunha.

A fenilalanina amônia-liase atua na defesa da planta e está relacionada com a síntese de compostos fenólicos (OLIVEIRA et al., 2016). Marek (2018) demonstrou esta relação em plantas de tomateiro, tratadas com estrobilurinas e carboxamidas e inoculadas com *A.solani*, onde as maiores concentrações de compostos fenólicos foram influenciadas pela atividade da enzima PAL, pois os picos são observados nos mesmos horários. Os compostos fenólicos possuem atividade redutora, protegendo o sistema de defesa da planta, podendo atuar como substratos para a síntese de lignina (LI e STEFFENS, 2002; GERASIMOVA et al., 2003; SILVA et al., 2010).

4.5.4 Atividade de Polifenoloxidase (PPO)

O pico de atividade de PPO foi em 24h após inoculação (72h AAT) em plantas tratadas com mix de PKM16. Em 48h após a inoculação (96h AAT) o melhor foi o mix e os demais não diferiram entre si (Figura 25). Os resultados se assemelham aos encontrados por Li et al. (2015), onde a atividade de PPO aumentou rapidamente no terceiro dia de aplicação de 1% de *B. amyloliquefaciens* LJ02. As PPOs tem sua atividade aumentada após a ocorrência de danos na célula (THIPYAPONG et al., 2004), logo está diretamente relacionada a penetração do patógeno.

A enzima polifenoloxidase PPO está fortemente relacionada à PAL, pois oxida os compostos fenólicos, favorecendo a formação de H₂O₂ e colaborando com a biossíntese de lignina (YUAN et al., 2002). Um destes fenóis é o ácido clorogênico e o produto da sua oxidação pode dificultar a entrada de patógenos na planta, a partir da formação de barreiras fenólicas polimerizadas na parede celular, e/ou gerarem um ambiente desfavorável para o desenvolvimento do patógeno.

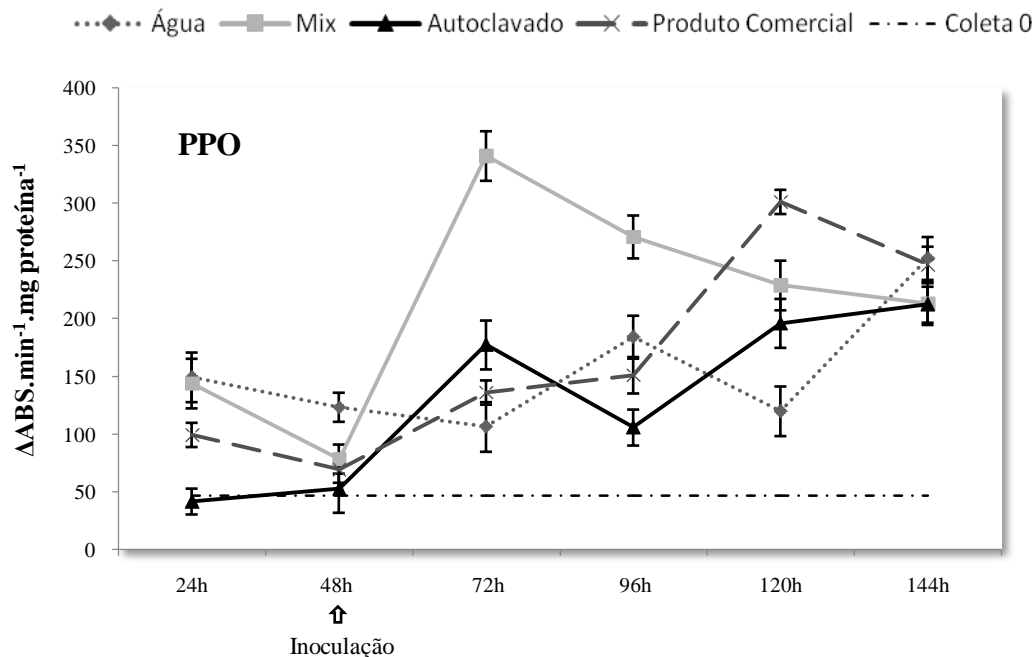


Figura 25 - Atividade da enzima Polifenoloxidase – PPO ($\Delta\text{ABS} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg} \text{ proteína}^{-1}$) em plantas de tomate Micro-Tom as 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas após a aplicação dos tratamentos (AAT) mix 20% e mix autoclavado 20% de *Bacillus amyloliquefaciens* PKM16, produto comercial e água destilada autoclavada; e com inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum* em 48h AAT. Barras referem-se ao desvio padrão da média.

4.5.5 Atividade de β -1,3 glucanase (GLU)

Além das enzimas POD, CAT, PPO e PAL, pode-se citar como enzima sinalizadora de respostas de indução de resistência, a enzima β -1,3-glucanase. A atividade de β -1,3 glucanase começou a crescer 48h após a aplicação dos tratamentos, ou seja, no dia da inoculação do patógeno. O pico de atividade ocorreu em 96h após a inoculação (144h AAT) com mix de PKM16. Em 24h após a inoculação, o produto comercial foi o melhor tratamento em relação a atividade da enzima (Figura 26).

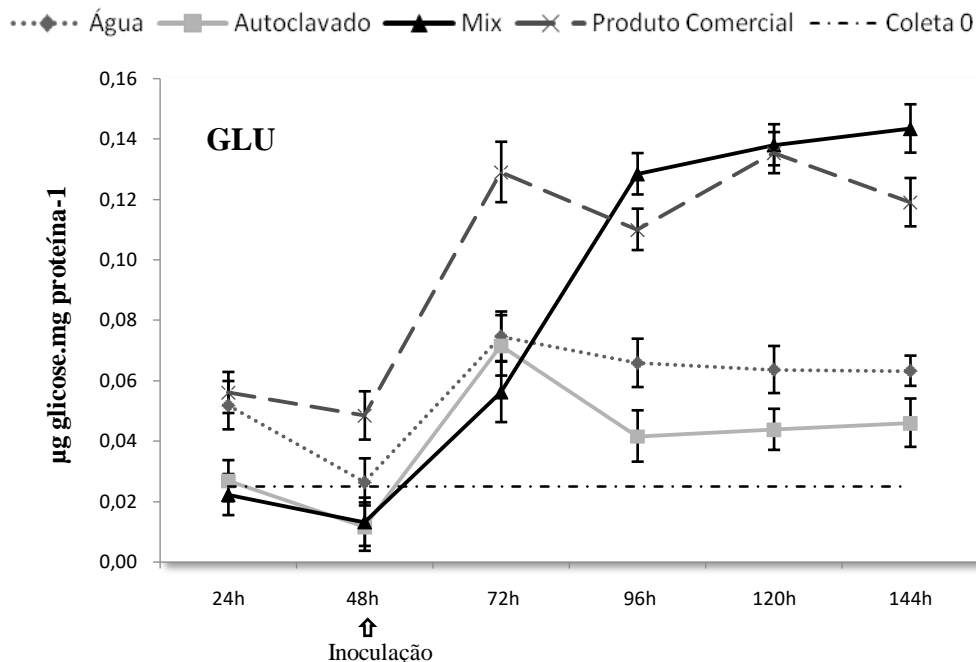


Figura 26 - Atividade da enzima β -1,3 glucanase – GLU ($\mu\text{g glicose.mg prote\u00edna}^{-1}$) em plantas de tomate Micro-Tom as 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas ap\u00f3s a aplica\u00e7\u00e3o dos tratamentos (AAT) mix 20% e mix autoclavado 20% de *Bacillus amyloliquefaciens* PKM16, produto comercial e \u00e1gua destilada autoclavada; e com inocula\u00e7\u00e3o de *Sclerotinia sclerotiorum* em 48h AAT. Barras referem-se ao desvio padr\u00e3o da m\u00e9dia.

A β -1,3-glucanase est\u00e1 relacionada \u00e0 hidr\u00f3lise da parede celular de fungos. Quando o pat\u00f3geno infecta a planta, ocorre uma pequena s\u00edntese de β -1,3-glucanase que atua na lamela m\u00e9dia das plantas. \u00c0 medida que o pat\u00f3geno cresce, as hifas s\u00e3o degradadas pela enzima e estas estruturas hidrolisadas atuam como sinalizadores e induzem \u00e0 s\u00edntese, em maior concentra\u00e7\u00e3o, de β -1,3-glucanases. Quanto mais o pat\u00f3geno consegue colonizar, mais enzimas s\u00e3o liberadas para conter a coloniza\u00e7\u00e3o (STANGARLIN et al., 2011).

A atividade enzim\u00e1tica observada neste trabalho pode ter sido induzida por metab\u00f3litos produzidos pela bact\u00e9ria, pelas pr\u00f3prias c\u00e9lulas bacterianas e pelo pr\u00f3prio pat\u00f3geno. Todas est\u00e3o de fato relacionadas \u00e0 defesa da planta e ao estresse bi\u00f3tico. O tomateiro Micro-Tom apresenta um ciclo de vida extremamente curto (TANKSLEY, 1993; MEISSNER et al., 1997), logo deduz-se que seu metabolismo \u00e9 extremamente r\u00e1pido. Em adi\u00e7\u00e3o, o fungo *S. sclerotiorum* \u00e9 extremamente agressivo (JACCOUD FILHO et al., 2017), destruindo completamente as plantas de tomate Micro-Tom em menos de uma semana. A uni\u00e3o destes dois fatores explica a acentuada influ\u00eancia do desenvolvimento do pat\u00f3geno na ativa\u00e7\u00e3o enzim\u00e1tica em 6 dias ap\u00f3s a inocula\u00e7\u00e3o.

Esta expressiva indução diluiu a indução da atividade das enzimas realizada pelos tratamentos a base de PKM16 e do produto comercial a base de *B. subtilis*. Tratamentos como a testemunha e o mix autoclavado de PKM16, que nos ensaios anteriores já se mostrou não tão eficiente quanto o mix no controle do mofo branco, foram os que se destacaram no 6º dia. Logo, conclui-se que, como não são tão eficientes, o patógeno se desenvolveu mais em relação ao mix e ao produto comercial, causando maior estresse à planta e, em consequência, maior ativação das enzimas. Observa-se, portanto, que as células lisadas presentes no mix autoclavado não liberaram oligômeros suficientes para induzir respostas de defesa pela planta, bem como alguns dos compostos produzidos são termolábeis.

5 CONCLUSÕES

- i) A rizobactéria *Bacillus amyloliquefaciens* cepa PKM16 é antagonista ao fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, mostrando-se eficiente na inibição de seu crescimento micelial *in vitro*;
- ii) A concentração mínima do caldo bacteriano que melhor inibiu o desenvolvimento do fungo foi de 20%;
- iii) O efeito residual da aplicação das células bacterianas juntamente com seus metabólitos (mix) em plantas de tomate Micro-Tom é de quatro dias, superior ao mix autoclavado, que é de dois dias;
- iv) O tratamento PKM16 mix foi superior aos demais em relação à inibição de germinação de escleródios, com inibição de quase 30% no 7º dia;
- v) A aplicação dos tratamentos a base de PKM16 induziu a atividade das enzimas peroxidase de guaiacol, catalase, fenil alanina amônia-liase, polifenoloxidase e β -1,3-gluconase.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5th Ed. Amsterdam. Elsevier Academic Press. 2005.
- AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons Acessado em: 09 mar 2020.
- ALMEIDA, D. **Manual de Culturas Hortícolas**, 3 ed. vol. 1. Editorial Presença. 2006. 952p
- ALVARENGA, M. A. R. **Tomate: produção em campo, casa de vegetação e hidroponia**. 2 ed., Lavras: UFLA, 2013. 455p.
- AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos**, v 1, 5 ed. Ouro Fino: Editora Agronômica Ceres Ltda. 2018. 573p.
- AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; CAMARGO F. A. **Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas**. v 2. 5 ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda., 2016. 810p.
- AMORIM, L.; PASCHOLATI, S. F. Ciclo das Relações Patógeno-Hospedeiro. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos**, v 1, 5 ed. Ouro Fino: Editora Agronômica Ceres Ltda. 2018. 573p.
- BARBOSA, M. R.; SILVA, M. M. A.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; CAMARA, T. R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, p. 453-460, 2014.
- BARROS, D. C. M.; FONSECA, I. C. B.; BALBI-PEÑA, M. I.; PASCHOLATI, S. F.; PEITL, D. C. Biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* and white mold of soybean using saprobic fungi from semi-arid areas of North eastern Brazil. **Summa Phytopathol**, v.41, p.251–255, 2015.
- BAUERMEISTER, A.; REZENDE, M. I.; GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. β -1, 3-Glucanases Fúngicas: produção e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 31, n. 2, p. 75-86, 2010.
- BAYSAL, O., SOYLU, E. M.; SOYLU, S. Induction of defence-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis ssp. michiganensis*. **Plant Pathology**, v. 52, p.747-753. 2003.
- BECKER, W.F. (Coord.); WAMSER, A. F.; FELTRIM, A. L.; SUZUKI, A.; SANTOS, J. P.; VALMORBIDA, J.; HAHN, L.; MARCUZZO, L. L.; MUELLER, S. **Sistema de produção integrada para o tomate tutorado em Santa Catarina**. Florianópolis, SC: Epagri, 2016. 149p.
- BERNARDES, F. S.; PATRICIO, F. R. A.; SANTOS, A. S.; FREITAS, S. S. Indução de resistência sistêmica por rizobactérias em cultivos hidropônicos. **Summa Phytopathol**. v.36, n.2 p.115-121. 2010.

BERTI FILHO, E.; MACEDO, L. P. M. **Fundamentos de controle biológico de insetos-praga**. Natal: IFRN Editora, 2010.108 p.

BINDSCHEDLER, L. F., BLEE, K. A., BUTT, V. S., DAVIES, D. R., GARDNER, S. L., GERRISH, C.; MINIBAYEVA, F. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. **Journal of Experimental Botany**, v.53, p. 1357-1376, 2002.

BOLAND, G. J., HALL, R. Epidemiology of white mold bean in Ontario. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.9, p. 218-224, 1987.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v.7, n.2, p.248-254. 1976.

BRAGA JUNIOR, G. M.; CHAGAS JUNIOR, A. F.; CHAGAS, L. F. B.; CARVALHO FILHO, M. R.; MILLER, L. O.; SANTOS, G. R. Controle biológico de fitopatógenos por *Bacillus subtilis in vitro*. **Biota Amazônia Macapá**, v. 7, n. 3, p. 45-51, 2017.

BROETTO, F. **Métodos de trabalho em bioquímica vegetal e tecnologia de enzimas**. 1. ed. Botucatu: Cultura Acadêmica, 2014. 92 p.

BROWN, M. E. Seed and root bacterization. **Annual Review of Phytopathology**, v.12, p.181-197, 1974.

CARISSIMI, M.; GIRAUDO, M.; GERMANI, J.; SAND, S. T. V. D. Antifungal activity of *Bacillus* sp. E164 against *Bipolaris sorokiniana*. **Biociências**, v. 17, n. 1, p. 48-58, 2009.

CARVALHO, C. R. F.; PONCIANO, N. J.; SOUZA, P. M.; SOUZA, C. L. M. SOUSA, E. F. S. Viabilidade econômica e de risco da produção de tomate no município de Cambuci/RJ, Brasil. **Ciência Rural**, v.44, n.12, p.2293-2299, dez, 2014.

CHEN, X. H.; KOUMOUTSI, A.; SCHOLZ, R.; SCHNEIDER, K.; VATER, J.; SUSSMUTH, R.; PIEL, J.; BORRISS, R. Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. **J Biotechnol**. v. 140, n.1-2, p.27-37, 2009.

CHOWDHURY, S. P.; HARTMANN, A.; GAO, X.; BORRISS, R. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42—a review. **Frontiers in Microbiology**, v 6, p 1-12, 2015.

CONSTABEL, C.P.; RYAN, C.A. A survey of wound- and methyl Jasmonate-induced leaf polyphenol oxidase in crop plants. **Phytochemistry**, v. 47, p 507-511, 1998.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of Trichoderma. III. Hyphal interactions. **Transactions British Mycological Society**, v. 57, n. 1, p. 363-369, 1971.

DI PIERO, R.M.; GARCIA JUNIOR, D.; TONUCCI, N.M. Indutores bióticos. In: CALVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.;

ROMEIRO, R.S. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p.29-50.

DUANGMAL, K.; APENTEN, R. K. O. A comparative study of polyphenol oxidases from taro (*Colocasia esculenta*) e potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). **Food Chemistry**, Barking, v. 64, p. 351-359, 1999.

DUBEY, R. S. Metal toxicity, oxidative stress and antioxidative defense system in plants. In: GUPTA, S. D. (Ed.) **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science Publishers, p.178-203. 2010.

DUDLEY, W. N.; WICKHAM, R.; COOMBS, N. An Introduction to Survival Statistics: Kaplan-Meier Analysis. **Journal of the advanced practitioner in oncology**, v. 7, n.1, p. 91–100, 2016.

FAO. Food and Agricultural Organization of the United States Statistics Division. 2017. Disponível em: <http://faostat.fao.org/> Acessado em: 01 nov 2019.

FARAHANI, A. S.; TAGHAVI, S. M. Induction of resistance in tomato against *Xanthomonas perforans* by lipopolysaccharides of the pathogen, **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v 50, p13-14,649-657,2017.

FILIPENKO, E. A.; KOCHETOV, A. V.; KANAYAMA, Y.; MALINOVSKY, V. I.; SHUMNY, V. K. PR-proteins with ribonuclease activity and plant resistance against pathogenic fungi. **Russian Journal of Genetics: Applied Research**, v. 3, n. 6, p. 474-480, 2013.

FURLANI, A. C. F. A.; CAMARGO, M.; PANIZZI, R. C.; PEREIRA, C. F. Atividade de células, filtrado e autoclavado de *Bacillus* spp. como bioagentes de controle de *Colletotrichum acutatum*. **Científica**, v.35, n.2, p.196 - 200, 2007.

GAO, Z.; ZHANG, B.; LIU, H.; HAN, J; ZHANG, Y. Identification of endophytic *Bacillus velezensis* zsy-1 strain and antifungal activity of its volatile compounds against *Alternaria solani* and *Botrytis cinérea*. **Biol. Control**, v 105, pp. 27-39, 2017.

GERASIMOVA, N.G.; PRIDVOROVA, S.M.; OZERETSKOVSKAYA, O.L. Role of L-phenylalanine ammonia-lyase in the induced resistance and susceptibility of potato plants. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.41, p.103-105, 2005.

GIORGIO A.; ANGELO, S.; PIETRO C.; NICOLA S. I. Biocide effects of volatile organic compounds produced by potential biocontrol rhizobacteria on *Sclerotinia sclerotiorum*. **Frontiers in Microbiology**, v 6, p. 1056, 2015.

GOMES, N. S. B.; GRIGOLETTI JUNIOR, A.; AUER, C. G. Seleção de antagonistas para o controle de *Cylindrocladium spathulatum* em erva-mate. **Bol. Pesq. Fl.**, Colombo, n.43, p.123-138, 2001.

GOPAL, N.; HILL, C; ROSS, P. R.; BERESFORF, T. P.; FENELON, M. A.; COTTER, P. D. The prevalence and control of *Bacillus* and related spore-forming bacteria in the dairy industry. **Front Microbiol.** v. 6, 1418, 2015.

GORJANOVIĆ, S. A Review: Biological and Technological Functions of Barley Seed Pathogenesis-Related Proteins (PRs). **J. Inst. Brew**, v.115, n.4, p.334–360, 2009.

GÓTH, L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. **Clinica Chimica Acta**, v.196, p.143-151, 1991.

GROVER, M.; NAIN, L.; SINGH, S.B.; SAXENA, A. K. Molecular and biochemical approaches for characterization of antifungal trait of a potent biocontrol agent *Bacillus subtilis* RP24. **Curr Microbiol**, v. 60, n. 2, p.99–106, 2010.

GUEVARA-AVENDAÑO, E.; BEJARANO-BOLÍVAR, A. A.; KIEL-MARTÍNEZ, A. L.; RAMÍREZ-VÁZQUEZ, M.; MÉNDEZ-BRAVO, A.; WOBESER, E. A.; SÁNCHEZ-RANGEL, D.; GUERRERO-ANALCO, J. A.; ESKALEN, A.; REVERCHON, F. Avocado rhizobacteria emit volatile organic compounds with antifungal activity against *Fusarium solani*, *Fusarium* sp. associated with Kuroshio shot hole borer, and *Colletotrichum gloeosporioides*. **Microbiological Research**, v 219, p 74-83, 2019.

GUEVARA-AVENDAÑO, E.; CARRILLO, J. D.; NDINGA-MUNIANIA, C.; MORENO, K.; MÉNDEZ-BRAVO, A.; GUERRERO-ANALCO, J.A.; ESKALEN, A.; REVERCHON, F. Antifungal activity of avocado rhizobacteria against *Fusarium euwallaceae* and *Graphium* spp., associated with *Euwallacea* spp. nr. *forficatus*, and *Phytophthora cinnamomi*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v 111, pp. 563-572, 2018.

GUPTA, P.; BANSAL, M. P.; KOUL, A. Evaluating the effect of lycopene from *Lycopersicon esculentum* on apoptosis during NDEA induced hepatocarcinogenesis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v 434, n3, p 479-485, 2013.

HAMMERSCHMIDT, R.; MÉTRAUX, J. P.; VAN LOON, L. C. Inducing resistance: a summary of papers presented at the First International Symposium on Induced Resistance to Plant Diseases, Corfu, May 2000. **European Journal of Plant Pathology**, v. 107, n. 1, p. 1-6, 2001.

HAYAT, R. ALI, S.; AMARA, U.; KHALID, R.; AHMEDSOIL, I. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. **Annals of Microbiology**, v.60, p.579-598, 2010.

INOUE-NAGATA, A. K.; LOPES, C. A.; REIS, A.; PEREIRA, R. B.; QUEZADO-DUVAL, A. M.; PINHEIRO, J. B. ; LIMA, M. F. Doenças do Tomateiro. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; CAMARGO F. A. **Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas**. v 2. 5 ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda., 2016. 697p.

HUANG, C.; LIN, C.; HSIEH, F.; LEE, S.; CHENG, K.; LIU, C. Characterization and evaluation of *Bacillus amyloliquefaciens* strain WF02 regarding its biocontrol activities and genetic responses against bacterial wilt in two different resistant tomato cultivars. **World J Microbiol Biotechnol** v. 32, p.183, 2016.

HOFFMAN, D. D.; DIERS, B. W.; HARTMAN, G. L.; NICKELL, C. D.; NELSON, R.L.; PEDERSEN, W.L.; COBER, E.R.; GRAEF, G.L.; STEADMAN, J.R.; GRAU, C.R.; NELSON, B.D.; DEL RIO, L.E.; HELMS, T.; ANDERSON, T.; POYSA, V.; RAJCAN, I.;

STIENSTRA, W.C. Selected soybean plant introductions with partial resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, v.86, p.971-980, 2002.

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFICA E ESTATÍSTICA). Sistema de recuperação automática – SIDRA. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, 2020.

IHAKA, R.; GENTLEMAN, R. R: A Language for Data Analysis and Graphics. **Journal of Computational and Graphical Statistics**, v. 5, n. 3, p. 299-314, 1996.

ITAKO, A.T.; TOLENTINO JÚNIOR, J. B.; SILVA JÚNIOR, T. A. F. D. S.; SOMAN, J. M.; MARINGONI, A. C. Efeito de produtos químicos sobre a mancha bacteriana (*Xanthomonas perforans*) e na ativação de proteínas relacionadas à patogênese em tomateiro. **Idesia (Arica)**, v. 30, n. 2, p. 85-92, 2012.

JACCOUD FILHO, D. S.; HENNEBERG, L.; GRABICOSKI, E. M. G. **Mofo Branco: Sclerotinia sclerotiorum**. Ponta Grossa: Toda palavra, 2017. 520p

JONES, J. B.; JONES, J. P.; STALL, R. E.; ZITTER, T. A. (Ed.). **Compendium of tomato diseases**. St. Paul: APS, 1991

KABBAGE, M.; YARDEN, O. DICKMAN, M. B. Pathogenic attributes of *Sclerotinia sclerotiorum*: Switching from a biotrophic to necrotrophic lifestyle. **Plant Science**, n.233, p.53-60, 2015.

KANG, S. M.; RADHAKRISHNAN, R.; LEE, I. J. *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* GR53, a potent biocontrol agent resists Rhizoctonia disease on Chinese cabbage through hormonal and antioxidants regulation. **World J. Microbiol. Biotechnol.** v.31, p.1517–1527, 2015.

KAPLAN E L, MEIER P. Nonparametric estimation from incomplete observations. **Journal of the American Statistical Association.**, v. 53, p.457–481, 1958.

KLOEPPER, J. W.; ZABLOTOWICZ, R. M.; LIFSHITZ, R. Plant growth-promoting mediated by rhizosphere colonizers. In: KEISTER, D. L.; CREGAN, P. B. (Ed.). **The rhizosphere and plant growth**. Dordrecht: Academic Publishers, 1990. p.315-326.

LANE, D; DENTON-GILES, M.; DERBYSHIRE, M.; KAMPHUIS, L. G. Abiotic conditions governing the myceliogenic germination of *Sclerotinia sclerotiorum* allowing the basal infection of *Brassica napu*. **Australasian Plant Pathology** v.48, n. 2, p.85–91, 2019.

LEHMANN, S.; SERRANO, M.; L'HARIDON, F.; TJAMOS, S. E.; METRAUX, J. P. Reactive oxygen species and plant resistance to fungal pathogens. **Phytochemistry**, v. 112, p. 54-62, 2015.

LEITE, R. M. V. B. de C. **Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja**. EmbrapaSoja, 76. 2005.

LEVER, M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. **Analytical Biochemistry**, v. 47, p. 273-279, 1972.

LI, B.; LI, Q.; XU, Z.; ZHANG, N.; SHEN, Q.; ZHANG, R. Responses of beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to different soilborne fungal pathogens through the alteration of antifungal compounds production. **Front Microbiol.** v.5, p. 636. 2014.

LI, L.; STEFFENS, J. C. Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. **Planta**, v. 215, p. 239–247, 2002.

LI, Y.; GU, Y.; LI, J.; XU, M.; WEI, Q.; WANG, Y. Biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* LJ02 induces systemic resistance against cucurbits powdery mildew. **Frontiers in Microbiology**, v 6, p. 1-15, 2015

LOCATO, V.; PINTO, M. C.; PARADISO, A.; GARA, L. Reactive oxygen species and ascorbate glutathione interplay in signaling and stress responses. In: GUPTA, S. D. (Ed.) **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science Publishers, p.178-203. 2010.

LUSSO, M. F. G.; PASCHOLATI, S. F. Activity and isoenzymatic pattern of soluble peroxidases in maize tissues after mechanical injury or fungal inoculation. **Summa Phytopathologica**, v.25, n.3. 1999.

MACHADO, V.; BERLITZ, D. L.; MATSUMURA, A. T. S.; SANTIN, R. C. M.; GUIMARÃES, A.; SILVA, M. E.; FIUZA, L. M. Rizobactérias como agentes de controle biológico de fitonematoides. **Oecologia Australia**, v. 16, n. 2, p. 65-182, 2012

MACIEL, C. G.; WALKER, C.; MUNIZ, M. F. B.; ARAUJO, M. M. Antagonismo de *Trichoderma* ssp. e *Bacillus subtilis* (UFV3918) a *Fusarium sambucinum* em *Pinus elliottii* engelm. **Rev. Árvore**, v.38, n.3, p.505-512, 2014.

MALLICK, N.; MOHN, F. H. Reactive oxygen species: response of algal cells. **Journal of Plant Physiology**, v. 157, n. 2, p. 183-193, 2000.

MARCUZZO, L. L.; SCHULLER, A. Sobrevivência e viabilidade de escleródios de *Sclerotium rolfsii* no solo. **Summa phytopathol.** v.40, n.3, pp.281-283, 2014.

MAREK, J. **Efeitos fisiológicos e metabólicos em tomateiro por estrobilurinas e carboxamidas**. Tese (doutorado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal. Guarapuava, 2018. 149 p.

MARGIS-PINHEIRO, M.; SANDRONI, M.; LUMMERZHEIM, M.; OLIVEIRA, D.E. A defesa das plantas conta as doenças. **Ciência Hoje**, v. 25, n. 147, p. 24-31, 1999.

MARIANO, R. L. R. Métodos de seleção "*in vitro*" para controle microbiológico. Revisão **Anual de Patologia de Plantas**, v 1, p.369-409, 1993.

MARTÍ, E.; GISBERT, C.; BISHOP, G. J.; DIXON, M. S. Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 9, p. 2037-2047, 2006.

MARTINEZ-VALVERDE, I; PERIAGO, M.J; PROVAN, G. Phenolic compounds, lycopene and antioxidant activity in commercial varieties of tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 82, p.323-330, 2002.

MARTINS, E. M. F. Proteínas relacionadas à patogênese. In: PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J. R.; CIA, P. (ORG). **Interação Planta Patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**, Piracicaba: FEALQ, p. 387-410. 2008.

MEISSNER, R.; JACOBSON, Y.; MELAND, S.; LEVYYATUY, S.; SHALEV, G.; ASHRI, A.; ELKIND, Y.; LEVY, A. A new model system for tomato genetics. **Plant journal**, v.12, p.1465-1472, 1997.

MÉNDEZ-BRAVO, A.; CORTAZAR-MURILLO, E. M.; GUEVARA-AVENDAÑO, E.; CEBALLOS-LUNA, O.; RODRÍGUEZ-HAAS, B.; KIEL-MARTÍNEZ, A.L.; HERNÁNDEZ-CRISTÓBAL, O.; GUERRERO-ANALCO, J.A.; REVERCHON, F. Plant growth-promoting rhizobacteria associated with avocado display antagonistic activity against *Phytophthora cinnamomi* through volatile emissions. **PLoS One**, v 13, n 3, p. e0194665, 2018

MENG, Q. X., JIANG, H. H., HANSON, L. E., HAO, J. J. Characterizing a novel strain of *Bacillus amyloliquefaciens* BAC03 for potential biological control application. **Journal of applied microbiology**, v. 113, n.5, p. 1165-1175, 2012.

MEYER, M.C.; CAMPOS, H.D.; GODOY, C.V.; UTIAMADA, C.M. **Ensaio cooperativos de controle biológico de mofo-branco na cultura da soja: safras 2012 a 2015**. Londrina: Embrapa Soja. 2016. 100 p.

MICHEREFF, S.J.; SILVEIRA, N.S.S.; MARIANO, R. L.R. Antagonismo de bactérias sobre *Colletotrichum graminicola* e potencial de biocontrole da antracnose do sorgo. **Fitopatol. Brasileira**, v.19, n.4, p.541-545, 1994.

MIORANZA, T. M.; STANGARLIN, J. R.; MÜLLER, M. A.; COLTRO-RONCATO, S.; MEINERZ, C. C.; INAGAKI, A. M.; SWAROWSKY, R. A.; ESTEVEZ, R. L.; SCHONS, B. C.; KUHN, O. J. Control of Meloidogyne incognita in tomato plants with highly diluted solutions of *Thuyaoccidentalis* and their effects on plant growth and defense metabolism. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, n. 4, p. 2187-2200, 2017.

MONTEIRO, C. S.; BALBI, M. E.; MIGUEL, O. G.; PENTEADO, P. T. P.S.; HARACEMIV, S. M. C. Qualidade nutricional e antioxidante do tomate “tipo italiano”. **Alim. Nutr.**, v.19, n.1, p. 25-31, 2008.

MORAES, C. M.; LEWIS, W. J. Examining plant-parasitoid interactions in tritrophic systems. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 29, p.189-203, 2000.

MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Controle Biológico de Doenças de Plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Org.). **Biocontrole de Doenças de Plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna-SP: EmbrapaMeioAmbiente, 2009. p. 7-14.

MUELLER, D. S.; DORRANCE, A. E.; DERKSEN, R. C.; OZKAN, E.; KURLE, J. E.; GRAU, C. R.; GASKA, J. M.; HARTMAN, G. L.; BRADLEY, C. A.; PEDERSEN, W. L.

Efficacy of fungicides on *Sclerotinia sclerotiorum* and their potential for control of *Sclerotinia stem* rot on soybean. **PlantDis.** v.86, p.26-31. 2002.

NAIKA S; JEUDE JL; GOFFAU M; HILMI M; DAM B. **A cultura do tomate: produção, processamento e comercialização.** Wageningen: Fundação Agromisa e CTA. 2006. 104 p.

NAPOLEAO, R.; NASSER, L.; LOPES, C.; CAFE FILHO, A. Neon-S, novo meio para detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes. **Summa phytopathol.** v.32, n.2 pp.180-182, 2006.

NICK, C.; SILVA, D.; BORÉM, A. **Tomate do plantio à colheita.** Viçosa - MG: Editora UFV, 2018. 237p.

OLIVEIRA, M. D. M.; VARANDA, C. M. R.; FÉLIX, M. R. F. Induced resistance during the interaction pathogen x plant and the use of resistance inducers. **Phyto chemistry letters**, v. 15, p. 152-158, 2016.

PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORREA-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. **Controle biológico no Brasil: parasitoides e predadores.** São Paulo: Editora Manole. 2002. 609p.

PASCHOLATI, S. F.; DALIO, R. J. D. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed). **Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos**, v 1, 5 ed. Ouro Fino: Editora Agronômica Ceres Ltda. 2018. 573p

PINTO, M. S. T.; RIBEIRO, J. M.; OLIVEIRA, E. A. G. O estudo de genes e proteínas de defesa em plantas. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 9, n. 2, p. 241-248, 2011

PRIEST, F. G.; GOODFELLOW, M., SHUTE, L. A.; ANDBERKELEY, R. C. W. *Bacillus amyloliquefaciens* sp nov, nom rev. **Int. J. Syst. Bacteriol.** v.37, p. 69–71. 1987 doi: 10.1099/00207713-37-1-69

QIAO, J.; WU, H.; HUO, R.; GAO, J.; BORRISS, R. Stimulation of plant growth and biocontrol by *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. plantarum FZB42 engineered for improved action. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v.1, n.12, 2014.

RABINOVITCH, L.; OLIVEIRA, E. J. **Coletânea de procedimentos técnicos e metodologias empregadas para o estudo de Bacillus e gêneros esporulados aeróbios correlatos.** Rio de Janeiro: Montenegro Comunicação, 2015. 160p.

RECZEK, C. R.; CHANDEL, N. S. ROS-dependent signal transduction. **Current opinion in cell biology**, v. 33, p. 8-13, 2015.

REIS, A.; COSTA, H.; LOPES, C. A. **Epidemiologia e manejo do mofo-branco em hortaliças.** Brasília: Embrapa Hortaliças, 2007.

RENZI, A.; HENZ, A. P.; ZIDORA, C. B.M. SHIKIDA, P. F. A. Evolução do controle biológico de insetos e pragas no setor canavieiro: uma análise na perspectiva econômica. **Rev. Agro. Amb.**, v. 12, n. 2, p. 459-485, 2019.

RESENDE, M. L. V.; BARRETI, P. B.; MEDEIROS, F. C. L.; SILVA, D.; PEREIRA, R. B.; LINS, S. R. O.; PEREIRA, L. M.; CAMPOS, M. A. Percepção e transdução de sinais para a ativação de respostas de defesa em plantas contra patógenos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas, Passo Fundo**, v. 15, p. 173-242, 2007.

ROCHA, D. J. A.; MOURA, A. B. Biological control of tomato wilt caused by *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by rhizobacteria. **Tropical Plant Pathology**, v 38, n. 5, p.423-430, 2013.

SCHIPPERS, B.;BAKKER, A. W.; BAKKER, P. A. H. M. Beneficial and deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. **Annual Review of Phytopathology**, v.5, p.339- 358, 1987.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J. R.; CIA, P. **Interação Planta Patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, p. 227-248. 2008.

SEDLAŘOVA, M. et al. Localisation and metabolism of reactive oxygen species during *Bremia lactucae* pathogenesis in *Lactuca sativa* and wild *Lactuca* spp. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 45, p. 607-616, 2007.

SHAH, J.; CHATURVEDI, R.; CHOWDHURY, Z.; VENABLES, B.; PETROS, R.A. Signaling by small metabolites in systemic acquired resistance. **The Plant Journal**, v. 79, n. 4, p. 645-658, 2014.

SHANER, G.; FINNEY, R. E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow mildew resistance in knox wheat. **Phytopathology**, v. 67, p. 1051-1056, 1977.

SHARMA, P.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, v. 12, p. 1-26, 2012.

SHIKATA, M.; EZURA, H. Micro-Tom Tomato as an Alternative Plant Model System: Mutant Collection and Efficient Transformation. **Methods Mol Biol.**, v.1363, p.47-55,2016.

SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. S.; KOBLITZ, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SINGH, D.; YADAV, D. K.; CHAUDHARY, G.; RANA, V. S.; SHARMA, R. K. Potential of *Bacillus amyloliquefaciens* for Biocontrol of Bacterial Wilt of Tomato Incited by *Ralstonia solanacearum*. **Plant Pathol Microbiol**, v7, 2016.

SONG, Y.; CHEN, D.; LE, K.; SUN, Z.; ZENG, R. Enhanced tomato disease resistance primed by arbuscular mycorrhizal fungus. **Frontiers in plant science**, v. 6, n. 786, p. 1-13, 2015.

STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; TOLEDO, M. V.; PORTZ, R. L.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; PASCHOLATI, S. F. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 10, n. 1, p. 18-46, 2011.

STANGARLIN, J. R.; LEITE, B. Alterações fisiológicas na suscetibilidade. *In*: PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. **Interação Planta-Patógeno: Fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008, 627 p.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.M.; MÉTRAUX, J.P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, North Carolina, v. 35, p. 235-270, 1997.

TANKSLEY, S. D. Mapping polygenes. **Annual Review of Genetics**, v.27, p.205-233, 1993.

THIPYAPONG, P.; HUNT, M. D.; STEFFENS, J. C. Antisense downregulation of polyphenol oxidase results in enhanced disease susceptibility. **Planta**, v. 220, n. 1, p. 105-117, 2004.

TOLEDO, D.S.; COSTA, C.A.; BACCI, L.; FERNANDES, L.A.; SOUZA, M. F. Production and quality of tomato fruits under organic management. **Horticultura Brasileira**, v. 29, p. 253-257, 2011.

TOMÁNKOVÁ, K.; LUHOVÁ, L.; PETRIVALSKÝ, M.; PEÈ, P.; LEBEDA, A. Biochemical aspects of reactive oxygen species formation in the interaction between *Lycopersicon* spp. and *Oidiumneo lycopersici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.68, p.22-32, 2006.

UMESHA, S. Phenylalanine ammonia lyase activity in tomato seedlings and its relationship to bacterial canker disease resistance. **Phytoparasitica**, v. 34, n.1, p. 68-71, 2006.

VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review Phytopathology**, v. 44, n. 135-1362, 2006.

VENTURINI, G.; BRANDI, F.; BETTIOL, W. **Inibição do crescimento micelial e da germinação de esporos de *Thielaviopsisparadoxa* por *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus***. *In*: 8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC, Campinas, São Paulo, 2014.

VIEIRA JÚNIOR, J. R.; FERNANDES, C. F.; ANTUNES JÚNIOR, H.; SILVA, M. S.; SILVA, D. S. G.; SILVA, U. O. **Rizobactérias como agentes de controle biológico e promotores de crescimento de plantas**. Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia, 2013. 15 p.

VIEIRA, B. S.; VIEIRA, H. M. P.; SOUSA, L. A.; MENDONÇA, K. D. R. Potencial antagonístico de *Bacillus subtilis* (bsv-05) contra os patógenos radiculares do feijoeiro: *Fusarium* spp., *Macrophomina phaseolina* e *Rhizoctonia solani*. **CiênciaAgrícola**, v. 14, n. 1, p. 59-66, 2016.

VINODKUMAR, S.; NAKKEERAN, S.; RENUKADEVI, P.; MALATHI, V.G. Biocontrol potentials of antimicrobial peptide producing *Bacillus* species: multifaceted antagonists for the management of stem rot of carnation caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Front. Microbiol.**, v.8, p. 446, 2017.

VOGELSANG, R.; BARZ, W. Purification, characterization and differential hormonal regulation of a β -1,3-glucanase and chitinases from chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Planta**, v.189, p.60-69, 1993.

WILLEKENS, H.; CHAMNONGPOL, S.; DAVEY, M. Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C-3 plants. **EMBO Journal**, v. 16, n. 16, p. 4806-4816, 1997.

WILSON, F.; HUFFAKER, C. B. The physiology, scope and importance of biological control. In: HUFFAKER, C. H.; MESSENGER, P.S. (Eds). **Theory and Practice of Biological Control**. 1976.p.3–15.

WU, C.T.; BRADFORD, K. J. Class I chitinase and beta-1,3-glucanase are differentially regulated by wounding, methyl jasmonate, ethylene, and gibberellin in tomato seeds and leaves. **Plant Physiology**, v.133, p.263-273, 2003.

XU, Z.; SHAO, J.; LI, B.; YAN, X.; SHEN, Q.; ZHANG, R. Contribution of bacillomycin D in *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to antifungal activity and biofilm formation. **Appl Environ Microbiol**, v 79, p.808–815, 2013.

WHARTON, P.; KIRK, W. White mold Michigan Potato diseases series. **MSU Extension bulletin** E-2989, 2007.

YAO, S.Y.; GAO, X.W.; FUCHSBAUER, N.; HILLEN, W.; VATER, J.; WANG, J. S. Cloning, sequencing, and characterization of the genetic region relevant to biosynthesis of the lipopeptides iturin A and surfactin in *Bacillus subtilis*. **Curr Microbiol**, v.47, p.272–277, 2003.

YARZABAL, L.; CHICA, E. J. Role of rhizobacterial secondary metabolites in crop protection against agricultural pests and diseases. A In: GUPTA, V. K.; PANDEY, A. Ed **New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering: microbial secondary metabolites biochemistry and applications**. Elsevier, 2019. 367p

YUAN, Y. J.; LI, C.; HU, Z. D.; WU, J. C. A double oxidative burst for taxol production in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei* induced by oligosaccharide from *Fusarium oxysporum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, n. 6, p. 774-778, 2002.