



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



CARLOS ALBERTO CAVALCANTE DE ALBUQUERQUE

**POTENCIAL DE *Bacillus* spp. NO CONTROLE DE ESTRESSES BIÓTICO E
ABIÓTICO E NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE TOMATEIRO**

Botucatu

2017

CARLOS ALBERTO CAVALCANTE DE ALBUQUERQUE

**POTENCIAL DE *Bacillus* spp. NO CONTROLE DE ESTRESSES BIÓTICO E
ABIÓTICO E NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE TOMATEIRO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp Campus de Botucatu, para a obtenção do título de mestre em Agronomia (Proteção de Plantas).

Orientador: Profº Dr. Wagner Bettiol

**Botucatu
2017**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

C376p Albuquerque, Carlos Alberto Cavalcante de, 1993-
Potencial de *Bacillus* spp. no controle de estresses biótico e abiótico e na promoção de crescimento de tomateiro / Carlos Alberto Cavalcante de Albuquerque. - Botucatu: [s.n.], 2017
87 p.: fots. color., grafs. color., tabs.

Dissertação (Mestrado)- Universidade Estadual Paulista Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2017
Orientador: Wagner Bettiol
Inclui bibliografia

1. Tomate - Crescimento. 2. Estresse vegetal. 3. Controle biológico. 4. *Bacillus*. I. Bettiol, Wagner. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. III. Título.

Elaborada por Ana Lucia G. Kempinas - CRB-8:7310

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte"



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: POTENCIAL DE *Bacillus* sp. NO CONTROLE DE ESTRESSES BIÓTICO E ABIÓTICO E NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE TOMATEIRO

AUTOR: CARLOS ALBERTO CAVALCANTE DE ALBUQUERQUE

ORIENTADOR: WAGNER BETTIOL

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em AGRONOMIA (PROTEÇÃO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. WAGNER BETTIOL
Meio Ambiente (videoconferência) / EMBRAPA

Prof. Dr. DALTON VINÍCIO DORIGHELLO
Fitopatologia / Faculdade de Ensino Superior Santa Bárbara

Prof. Dr. CARLOS GILBERTO RAETANO
Depto de Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrômicas de Botucatu - UNESP

Botucatu, 12 de janeiro de 2018

Aos meus queridos pais,

Jackson e Jaqueline

Dedico.

AGRADECIMENTOS

- A Javé.
- À minha família, por todo apoio.
- Ao Prof. Dr. Wagner Bettiol, pela orientação e conselhos profissionais.
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.
- À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa, por todo subsídio.
- À Universidade Estadual Paulista – Unesp, pela oportunidade de enriquecer a minha formação.
- Às técnicas e analistas do Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa: Anamaria Dietzen, Elke Vilela, Marcia Parma e Rosely Nascimento, por todos os auxílios e ensinamentos.
- Aos colegas de pós-graduação e trabalho: Dalton Dorighello, Mércia Freitas, Lucas do Lago, Ana Paula Silva, Michelli Santos, Marta Moitinho, Laura Bonomi, Mayara Sonehara, Geovanny Barroso, Douglas Ribeiro e Paula Santos pelo carinho e companheirismo.
- Aos professores Renate Sakate, Regiane Bueno, Edson Baldin, Carlos Raetano, Antônio Maringoni, Adriana Kronka e Edson Furtado, pelos conhecimentos transmitidos para a minha formação.
- Ao Eng.º Msc. da Computação Nathanyel Sandi, pela o incentivo ao estudo da programação em linguagem R.
- Aos amigos: Flavio Pereira, Devanir Benhossi, Ricardo Souza, Elton Sabino, Cesar Santos e Diego Pereira, pelo companheirismo em São Paulo.

Se mover é melhor que ser perfeito.

Kahn Academy's Mantra

RESUMO

O gênero *Bacillus* tem demonstrado em diversos estudos eficiência no controle de estresses bióticos e abióticos, tornando-se uma alternativa viável para o manejo desses problemas. O objetivo desse estudo foi avaliar o potencial de isolados de *Bacillus* spp. em induzir resistência em plantas de tomateiro a estresses bióticos (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3 e *Oidium*), abiótico (estresse salino) e em promover crescimento. Inicialmente, foi realizada uma seleção *in vitro* utilizando testes bioquímicos (produção de ácido indol acético e sideróforos, solubilização de fosfato, fixação assimbiótica de nitrogênio e produção de celulase e de catalase) com 154 isolados. Posteriormente, com quatro isolados selecionados nessa primeira fase, mais um produto comercial à base de *Bacillus subtilis* QST-713, foram avaliados o potencial desses isolados na promoção de crescimento das plantas, na indução de resistência ao estresse salino e no controle de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* e *Oidium* em plantas de tomate. Os isolados de *Bacillus* estimularam o crescimento das plantas no ensaio de promoção de crescimento sem estresse salino. No segundo estudo avaliou-se a indução de resistência ao estresse salino mediada por *Bacillus* e foram observados efeitos dos isolados de *Bacillus* na altura das plantas aos 41 e 48 dias após a semeadura e para a massa do sistema radicular, também os isolados de *Bacillus* estimularam a produção das enzimas peroxidase, fenilalanina amônia-liase, polifenoloxidase e de L-prolina indicando que os isolados de *Bacillus* ativaram ao menos dois mecanismos de defesa contra o estresse com sal. O isolado AP3 foi o mais eficiente no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3 e de *Oidium* do tomateiro. Diante dos resultados conclui-se que o gênero *Bacillus* possui versatilidade em promover controle biológico e o desenvolvimento das plantas em situação de estresse.

Palavras-chave: *Bacillus*. estresse salino. promoção de crescimento. *Solanum lycopersicom*.

ABSTRACT

The *Bacillus* genus has demonstrated in several studies efficiency in the control of biotic and abiotic stresses, making it a viable alternative for the management of these problems. The objective of this study was to evaluate the potential of *Bacillus* spp. in inducing resistance in tomato plants to biotic stresses (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 and *Oidium*), abiotic (saline stress) and in growth promoting. Initially, an *in vitro* selection was performed using biochemical tests (indolacetic acid and siderophore production, phosphate solubilization, nitrogen assimilation and cellulase and catalase production) with 154 isolates. Then, with four isolates selected in this first phase, plus a commercial product based on *Bacillus subtilis* QST713, the potential of these isolates in the promotion of plant growth, induction of resistance to saline stress and in the control of *Fusarium* and *Oidium* in tomato plants were evaluated. *Bacillus* isolates stimulated plant growth in the growth promotion trial without saline stress. The second study evaluated the induction of resistance to saline stress mediated by *Bacillus* and observed effects of *Bacillus* isolates at plant height at 41 and 48 days after sowing and for root system mass. *Bacillus* isolates also stimulated production of the enzymes peroxidase, phenylalanine ammonia-lyase, polyphenoloxidase and L-proline, indicating that *Bacillus* isolates activated at least two defense mechanisms against salt stress. The AP3 isolate was the most efficient in the control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 and *Oidium* in tomato. We concluded that *Bacillus* has the versatility to promote biological control and the development of plants under stress.

Keywords: *Bacillus*. salt stress. growth promotion. *Solanum lycopersicom*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 A cultura do tomateiro	17
2.3 Gênero <i>Bacillus</i> na tolerância ao estresse salino	21
2.4 O estresse salino nas culturas	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Origem e manutenção de <i>Bacillus</i> spp.	27
3.2 Seleção dos isolados por métodos qualitativos	28
3.2.1 Produção de sideróforos.....	28
3.2.2 Produção de ácido indol acético AIA	28
3.2.3 Fixação assimbiótica de nitrogênio.....	30
3.2.4 Solubilização de fosfato	31
3.2.5 Produção de celulase.....	31
3.2.6 Produção de catalase	32
3.3 Promoção de crescimento do tomateiro.....	32
3.3.1 Preparo da suspensão bacteriana	32
3.3.2 Tratamento das sementes e semeadura	33
3.3.3 Preparo do substrato	34
3.3.4 Determinação da altura, diâmetro das hastes, concentração de clorofila, massa fresca e seca e enzimas das plantas.....	34
3.4 Indução de resistência ao estresse salino	34
3.5 Eficiência de <i>Bacillus</i> no controle de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	35
3.6 Eficiência de <i>Bacillus</i> no controle de <i>Oidium</i>	36
3.7 Parâmetros biométricos	37
3.7.1 Altura, diâmetro da haste, teor de clorofila e massa verde e seca da parte aérea e da raiz das plantas	37
3.8 Determinação da atividade enzimática	37
3.8.1 Coleta e armazenagem do material vegetal e obtenção do extrato bruto	37
3.8.2 Determinação da atividade de proteínas totais	38
3.8.3 Determinação da atividade de fenilalanina amônia-liase (FAL)	38
3.8.4 Determinação da atividade de polifenoloxidase (PPO).....	38
3.8.5 Determinação da atividade de peroxidase (PO).....	38
3.9 Determinação do teor de L-prolina.....	39
3.10 Delineamento experimental.....	39

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1 Seleção dos isolados de <i>Bacillus</i> spp.....	41
4.2 Promoção de crescimento do tomateiro	46
4.4 Eficiência de <i>Bacillus</i> no controle de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	62
5 CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIAS.....	72

1 INTRODUÇÃO

A busca pelo aumento da produção agrícola tem, coincidentemente, gerado diversas adversidades no sistema atual de produção, dentre elas problemas fitopatológicos e estresses abióticos. O tomateiro (*Solanum lycopersicom* L.) é um exemplo de uma cultura que está sempre necessitando de inovações para manter-se rentável. A produção de tomate é a maior entre as hortaliças com produção estimada, em 2017, de mais de 171,75 milhões de toneladas, em uma área cultivada de 5,023 milhões de hectares (FAO, 2018).

O estresse salino é um óbice bastante relevante para a cultura do tomate, o processo se deve ao acúmulo elevado de sais, geralmente Cl^- e Na^+ , nos perfis do solo (HAGEMANN; ERDMANN, 1997). O tomateiro é uma cultura moderadamente tolerante ao sal (MAAS, 1986), o que poderá variar de acordo com os cultivares (ALIAN et al., 2000; DASGAN et al., 2002), porém, no geral a planta tolera um nível de salinidade de até $2,5 \text{ dSm}^{-1}$ de condutividade elétrica (MAAS; HOFFMAN, 1977). Em contrapartida, para algumas cultivares, como a 'Jersey', solos salinizados podem ser responsáveis por uma maior qualidade do fruto, melhorando o sabor (HAO et al., 2000; DAVIS et al., 2003). Outro estresse importante para a cultura do tomateiro é o biótico, causado por fitopatógenos que pode reduzir a produtividade da cultura.

Realizar o manejo destes problemas, decorrentes das práticas agrícolas, é uma tarefa complexa que pode tornar-se, dependendo do caso, inviável economicamente (PRISCO, 1987). Desta forma, a prevenção dos problemas e o uso de métodos alternativos devem ser considerados no planejamento. O controle biológico, por meio de bactérias promissoras, é um método que colabora com a execução desta estratégia. Tais bactérias possuem mecanismos de ação distintos, que vão desde os efeitos diretos sobre os patógenos até a indução de resistência e promoção de crescimento (LUGTENBERG; KAMILOVA, 2009; COMPANT et al., 2010; KLEIN et al., 2016; KURATA et al., 2017).

Entre as bactérias, destacam as dos gêneros *Pseudomonas*, *Azobacter*, *Azospirillum*, *Rizhobiume*, em especial, *Bacillus* (BHATTACHARYYA; JHA, 2012). Vários estudos relataram a adaptação de espécies de *Bacillus* ao estresse salino: *B. subtilis* (HAHNE et al., 2010), *B. licheniformis* (HOFFMANN et al., 2013), *B. halodurans* (KITADA et al., 1994) e *B. pseudofirmus* (JANTO et al., 2011). Há relatos

também de controle de diversas doenças de plantas com *B. subtilis* (DORIGHELLO et al., 2015), *B. amyloliquefaciens* (KIM et al., 2015) e *B. firmus* (XIONG, et al., 2016).

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a versatilidade de isolados do gênero *Bacillus* em promover crescimento, induzir resistência a estresse salino, controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3 e *Oidium* em tomateiro.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura do tomateiro

O tomateiro é uma das hortaliças mais importantes do mundo, pertence a classe Dicotyledonae, ordem Tubiflorae, família Solanaceae e gênero *Solanum*. Esta planta possui ciclo anual e pode ter dois hábitos de crescimento: as plantas de crescimento indeterminado, com maior número de hastes utilizadas para um mercado mais exigente, e cultivares de crescimento determinado, que atingem de 0,70 a 1,20 m de altura e possuem menor número de hastes (PIOTTO; PERES, 2012).

O tomate tem seu centro de origem na América do Sul, mais precisamente na fronteira entre o Chile e o Equador, todavia a planta foi domesticada no México e introduzida na Europa pelos espanhóis, no início do século XVI (HARVEY et al., 2002; ANDRADE et al., 2009). O fruto teve uma aceitação no preparo de alimentos relativamente lenta, sendo usado inicialmente como planta ornamental. Presume-se que o fato tenha ocorrido devido à cor avermelhada do fruto, ao qual era considerado venenoso (FIGUEIRA, 2000). Desde então, o consumo de tomate vem aumentando exponencialmente, sendo utilizado na indústria em diversos produtos: molhos, sopas, bebidas e catchup (HARVEY et al., 2002) e cultivado para o consumo *in natura* (FERREIRA et al., 2004).

Estima-se que a área de produção de tomate seja de mais de 5,023 milhões de hectares, produzindo cerca de 170,75 milhões de toneladas. A produção é dividida para dois segmentos, o tomate industrializado e o tomate de mesa. Os dois processos são distintos e possuem características próprias que são exigidas no cultivo, que vão desde a variedade até o processo de beneficiamento. O Brasil encontra-se na nona posição em relação a produção de tomate (3,4 milhões de toneladas). A China é o maior produtor (52,58 milhões de toneladas), seguido da Índia (18,73 milhões de toneladas) e Estados Unidos (14,51 milhões de toneladas) (FAOSTAT, 2018).

O tomateiro adaptou-se bem às diferentes condições climáticas, como clima temperado e tropical úmido, todavia a temperatura ótima para seu cultivo é entre 21 e 24 °C (NAIAKA et al., 2006). É uma espécie vegetal com alta exigência hídrica,

devido ao crescimento de seu sistema radicular pouco tempo depois do transplante, que pode chegar a 1,5 m de profundidade. O estresse hídrico pode causar grandes perdas na fase de florescimento e maturação dos frutos, já que os mesmos, quando maduros, possuem cerca de 95% de água (MAROUELLI et al., 2012).

Solos arenosos, de profundidade elevada e bem drenados são ideais para o cultivo do tomateiro, no geral desenvolvem-se bem em solos de acidez moderada, com o pH na faixa entre 5,5 e 6,8 é propício para o cultivo (MIRANDA et al., 2011). A cultura é moderadamente tolerante ao sal, com consideráveis diferenças entre cultivares (DASGAN et al., 2002). De acordo com Mass e Hoffman (1977), a salinidade máxima tolerada pelo tomateiro é de 2,5 dS m⁻¹ no estágio de desenvolvimento inicial. Em geral, a salinidade promove um desequilíbrio nutricional em virtude da competição entre os sais e os nutrientes no processo de absorção (DEMIRAL, 2005).

O uso indiscriminado de agroquímicos na cultura do tomate tem acarretado em contaminações nos alimentos, contaminações de nascentes hídricas e prejuízos sobre a fauna (NAKANO, 1999). Com a aplicação frequente, ocorre a seleção de microrganismos fitopatogênicos com resistência aos princípios ativos, tornando o manejo fitossanitário mais complicado. Desta forma, os custos de produção se tornam altos e fazem com que os produtores procurem novas estratégias para se manterem no mercado (PARREIRA et al., 2009).

2.2 Gênero *Bacillus* como agente de controle biológico

O manejo de doenças mediado por microrganismos apresenta-se como alternativa para a redução do uso de agroquímicos. A versatilidade desses agentes, com seus diversos mecanismos de ação surgem como ferramenta importante para o manejo de doenças. Em especial com bactérias antagonistas muitos trabalhos foram desenvolvidos (RYAN et al., 2008; ALVINDIA et al., 2009; ZHANG et al., 2016).

O gênero *Bacillus* destaca-se por formar endósporos e apresentar uma multiplicidade de mecanismos de ação. A bactéria sobrevive em nichos ecológicos variados, com diversos mecanismos de ação para driblar as defesas dos fitopatógenos (ROMEIRO et al., 2005). As espécies do gênero *Bacillus* também são rizobactérias promotoras de crescimento em plantas e podem ser epifíticas e endofíticas (GUPTA et al., 2000). O gênero se destaca por ocupar nichos ecológicos

variados em simbiose com plantas, se estabelecendo na rizosfera, rizoplano, filoplano e nos tecidos internos (ONGENA et al., 2005). Em função disso, a bactéria se multiplica, sobrevive e protege-se da ação de antagonistas do restante da microbiota do solo (CAMPOS SILVA et al., 2008).

De modo geral, a bactéria sobrevive em condições desfavoráveis, como variações drásticas na temperatura, osmolaridade, alta concentração de sal e disponibilidade de fontes de carbono (LANNA FILHO et al., 2010). As células apresentam respostas adaptativas que envolvem o desenvolvimento de motilidade e a transformação genética por DNA exógeno (STRAGIER; LOSICK, 1996).

Quando o ambiente não é favorável para o seu desenvolvimento, há a formação de endósporos acionada por informações sensoriais. Há a paralização do ciclo de crescimento e divisão celular e a formação dos endósporos que são resistentes a agressões exógenas, permanecendo no solo por mais de 50 anos (CANO et al., 1995; GOMES, 2013).

Produtos à base de *Bacillus* spp. encontram-se no mercado e são usados comercialmente para o biocontrole de doenças de plantas, assim como para aumentar a produtividade das culturas (DIAS, 2016; LENTEREN et al., 2017). Os mecanismos de ação exercidos contra fitopatógenos são antibiose, síntese de substâncias antimicrobianas, competição por espaço e nutrientes e a síntese de compostos voláteis (LEELASHUPHAKUL et al., 2008). Há ainda um mecanismo indireto exercido pelo fenômeno da resistência induzida. Além das vantagens proporcionadas pelo uso do agente em plantas, alguns bioformulados levam em sua rotulagem a característica de amplo espectro contra fitopatógenos e o efeito adicional de promover crescimento das plantas (LANNA FILHO et al., 2010).

De acordo com Fickers (2012), 4% do genoma da espécie *Bacillus subtilis* é dedicado a síntese de substâncias antimicrobianas, entre elas está Polyketides (PKs), Peptídeos não ribossomais (NRPs) e bacteriocinas. As espécies *Bacillus amyloliquefaciens* e *B. subtilis* são conhecidas por produzirem iturinas, surfactinas e fengicinas, fortes antibióticos com amplos aspectos antifúngicos de interesse para o mercado farmacêutico (FIEDLER; HEERKLOTZ, 2015; SON et al., 2016). Há estudos que comprovam a eficiência dessas substâncias no controle de doenças causadas por diversos gêneros de fungos e oomycetos fitopatogênicos, como *Fusarium* (JIA et al., 2015), *Pythium* (ZOUARI et al., 2016), *Botrytis* (KEFI et al., 2015) e *Phytophthora* (YARULLINA et al., 2016).

O gênero *Bacillus* tem sido estudado nos últimos anos como agente de controle biológico para diversas doenças em diferentes culturas. A estirpe EDR4 de *B. subtilis* foi utilizada por Chen et al. (2014) no controle da podridão do caule causada por *Sclerotinia sclerotiorum* em *Brassicinapus*. Carrer Filho et al. (2015) selecionaram dois isolados, *B. subtilis* e *Bacillus circulans*, capazes de promover o biocontrole de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* em tomateiro. Também em tomateiro, *Bacillus cereus* acionou mecanismos de resistência através do aumento da atividade de enzimas de defesa (peroxidase, glucanase e polyphenoxidase) para murcha causada por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FERRAZ et al., 2014). Em repolho, *B. amyloliquefaciens* controlou a doença causada por *Rhizoctonia solani* e manteve o desenvolvimento da planta (KANG et al., 2015).

Para doenças da parte aérea, como *Alternaria alternata*, que causa a pinta preta do tomateiro, Pane e Zarcadelli (2015) provaram que quatro cepas de *Bacillus* spp., isoladas a partir do filoplano de plantas da família Solanaceae, controlaram a doença através de antibiose. Yamamoto et al. (2014) verificaram a eficiência da estirpe S13-3 de *B. amyloliquefaciens* em desencadear resistência sistêmica para *Oidium* em tomateiro. A estirpe NKG-1 de *Bacillus methylotrophicus* foi isolado de solos vulcânicos dormentes na província de Jilin na China. Ge et al. (2016) comprovaram sua eficácia no controle do mofo cinzento do tomateiro mantendo as plantas em desenvolvimento, demonstrando que a espécie possui forte aplicação comercial como biofertilizante e agente de controle biológico.

De acordo com Torres et al. (2017), *B. amyloliquefaciens* (PGPBacCA1) foi eficiente em controlar fungos que atacam sementes de feijão das variedades cultivar Nag e cultivar Alubia. Entre os fungos controlados estão: *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp. e *Cladosporium* spp. Em frutos de tomate, o produto Rhapsody (*B. subtilis* QST-713) controlou *Penicillium* e *Rhizopus stolonifer* (PUNJA et al., 2016).

O gênero *Bacillus* também vem recebendo bastante atenção pela capacidade de promover crescimento nas espécies vegetais, isso ocorre devido a sua capacidade em solubilizar nutrientes, produzir hormônios vegetais e substâncias anti-microbianas (AMALRAJ et al., 2015). O isolado de *Bacillus* Rh219 aumentou os parâmetros biométricos da cultura do arroz e a atividade de enzimas de defesa (fenilalanina amônia-liase, polifenol oxidase e peroxidase) (YASMIN et al., 2016). Em estudo realizado em tomateiro, TAHIR et al. (2017) demonstraram que compostos

voláteis de *B. subtilis* (SYST2) induziram a produção de fitohormônios como auxina e citoquinina, que estão diretamente ligados à promoção de crescimento. Além da promoção do desenvolvimento das plantas, as bactérias do gênero *Bacillus* foram utilizadas em estudos que comprovaram sua eficiência na degradação de metais pesados do solo e indução de resistência a estresse hídrico e nutricional (CLEMENTE et al., 2016).

2.3 Gênero *Bacillus* na tolerância ao estresse salino

Em seu habitat natural, as bactérias convivem com alterações físico-químicas no ambiente, por conseguinte, a capacidade de se adaptar a ambientes não favoráveis é fator limitante para sua sobrevivência (WICK; EGLI, 2004). A tolerância à salinidade e tensão osmótica está sendo estudada em várias espécies bacterianas, como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas* spp. (KEMPF; BREMER, 1998; YACHANA et al., 2011).

A estratégia comum usada pelas bactérias para se adaptarem às concentrações elevadas de sal é baseada na biossíntese ou acumulação de solutos orgânicos compatíveis. Os mesmos não interferem significativamente com a atividade de enzimas em função normais, como osmoprotetores contra a salinidade (TSUZUKI et al., 2011). O estresse salino exerce efeitos pleitrópicos sobre a fisiologia microbiana, incluindo mudanças na composição da membrana (LOPEZ et al., 2006), propriedades da parede celular (LOPEZ et al., 1998), no conteúdo estrutural (LORET et al., 1995) e homeostase do ferro (HOFFMANN et al., 2002). A absorção de K e Na estão também entre os mecanismos comuns ativados diante da exposição ao estresse salino, resultando em altos níveis de íons de K intracelular (GLAASKER et al., 1998).

A maioria dos estudos sobre adaptação bacteriana ao estresse salino foi realizada em pH neutro ou próximo da neutralidade (GUNASEKERA, 2008). Para o gênero *Bacillus*, a adaptação ao sal de espécies neutras (*B. licheniformis*) e de espécies de *Bacillus* alcalificas (*B. pseudofirmus*) (ITO et al., 2004) foi estudada. A resposta geral dessas espécies bacterianas ao estresse salino, inclui genes de regulamentação osmótica e funcionalmente associados com a síntese de compostos de alívio ao estresse (HAHNE et al., 2010). Uma das primeiras respostas das células de *Bacillus* às condições de estresse é a indução imediata de um grande número de

proteínas codificadas pela sigma B dependente (BOYLAN et al., 1993). Tem sido verificado que 37 genes de regulamentação da sigma B estão envolvidos na adaptação ao sal (HOPER et al., 2005; YIN et al., 2015; KHARITONOVA et al., 2016), proteínas de regulação Sigma W e Sigma M, também são induzidas pelo estresse salino.

De acordo com Kim et al. (2017), os microrganismos capazes de promover a biofertilização são aqueles que conseguem estimular nas plantas uma melhor absorção de nutrientes e o aumento da atividade dos fitohormônios. As bactérias produtoras destes hormônios conseguem manter o desenvolvimento das espécies vegetais mesmo sob condições adversas, como o estresse salino (KANG et al., 2015). Um estudo realizado em soja sob condições de alta concentração de NaCl, demonstrou que um isolado bacteriano (H-2-5), identificado como *B. amyloliquefaciens*, induziu resistência da planta ao estresse abiótico, tal mecanismo de defesa está diretamente ligado ao aumento da atividade de ácido abscísico, giberelina e ácido jasmônico (KIM et al., 2017).

Outra característica importante que influencia a indução de resistência ao estresse salino é a capacidade do gênero *Bacillus* de colonizar as raízes. Experimentos realizados por Irizarry e White (2017) provaram que plantas de algodão tratadas com *B. amyloliquefaciens* e estressadas com sal obtiveram maior crescimento do sistema radicular comparadas com aquelas não tratadas com a bactéria, o estudo também provou que tais plantas conseguiram manter em funcionamento a absorção de nutrientes e água e conseqüentemente o crescimento.

O mecanismo de defesa das plantas contra estresses abióticos também inclui a produção de enzimas de defesa e osmoprotetores. Um estudo realizado em plantas de arroz estressadas com sal e tratadas com *B. amyloliquefaciens* (SN13), demonstrou o aumento da atividade de prolina, um osmolito responsável pela regulação do estresse iônico e osmótico causado pelo acúmulo de sal (TIWARI et al., 2017). Um experimento realizado em *Vigna radiata* tratada com *Bacillus cereus* (Pb25) e cultivada sob alta concentração de NaCl, demonstrou que a bactéria foi capaz de induzir o crescimento das plantas e aumentar a atividade de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase e peroxidase) responsáveis pela defesa contra o estresse oxidativo causado pelo acúmulo de sal na célula vegetal, além de aumentar o índice de prolina e glicina betaína, osmoprotetores (ISLAM et al., 2016).

2.4 O estresse salino nas culturas

Altas concentrações de sais na água e no solo causam três efeitos diretos nas espécies vegetais: diminuição no processo de absorção de água, desequilíbrio nos níveis iônicos e toxicidade (PARIDA; DAS, 2004). Ao serem expostas a um ambiente salino, as plantas são afetadas em todos os seus mecanismos e processos, como fotossíntese, síntese proteica e lipídica. Isso acarretará na diminuição do crescimento e expansão celular, o que diretamente afetará os níveis de produção (HAIASHY; MURATA, 1998).

Um solo é considerado salino quando afeta o desenvolvimento das culturas, isso ocorre quando a condutividade elétrica deste ambiente é igual ou superior a 2 dSm^{-1} (HOLANDA et al., 2010). A resposta inicial a esse estresse pode ser vista na redução da expansão foliar, internamente os níveis iônicos elevados ocasionam a degradação do citoplasma, inchaço mitocondrial e fragmentação do tonoplasto, inviabilizando a célula vegetal (ZIDAN et al., 1990). Tais fatos podem ser observados em diversas culturas como o algodão (LONGSTRETH; NOBEL, 1979), *Bruguiera parviflora* (PARIDA et al., 2004) e tomateiro (ROMEROARANDA et al., 2001).

O excesso de sal provoca problemas na hidráulica das raízes e conseqüentemente prejudica a absorção de água e de nutrientes (SOHAN et al., 1999). Os potenciais osmóticos e hídricos tornam-se negativos, internamente a pressão de turgescência aumenta o que prejudica diretamente a célula vegetal, podendo corrompê-la (KHAN, 2001; MELONI et al., 2003). Desta forma, o estresse salino está diretamente ligado a um estresse hídrico e iônico, o acúmulo dos mesmos pode ocasionar a morte dos tecidos vegetais afetando vários processos metabólicos (MUNNS, 2002; KRONZUCKER E BRITTO, 2011; SCHROEDER et al., 2013).

A fotossíntese é um dos processos diretamente afetado pelo acúmulo de sal. No geral, os pigmentos fotossintéticos sofrem uma diminuição sob estas condições, e em um curto período de tempo o carbono para de ser assimilado pelas folhas mais velhas e a longo prazo também pelas folhas mais novas (MUNNS; TERMAT, 1986; AGASTIAN et al., 2000). Há também a diminuição nos teores de proteína solúvel

(GALLADAH, 1999) e nos lipídios (HASSANEIN, 1999; ISAYENKOV 2012), podendo variar entre as espécies vegetais.

Devido à pressão osmótica dentro da célula o estresse salino ocasiona a formação de espécies de oxigênio reativas (peróxido de hidrogênio, radical superóxido e radicais hidroxilas) que podem modificar o metabolismo normal da célula (ALSCHER et al., 1997). As espécies vegetais utilizam um mecanismo de defesa antioxidante para combaterem essa toxicidade, utilizando enzimas de defesa como a catalase, dismutase do superóxido e redutase da glutaciona (SHALATA et al., 2001).

Outro mecanismo da tolerância ao estresse salino nas plantas é compartimentalização de íons em tecidos distintos, para evitar o estresse osmótico e iônico e manter a célula vegetal em funcionamento (NIU et al., 1995). Ainda, para conseguir manter a tolerância ao estresse salino, as plantas necessitam executar um ajuste osmótico. Desta forma, seu sistema de defesa produz em grande quantidade osmólitos ou solutos compatíveis, como prolina, betaína, glicina, trealose, frutose e glicerol. Tais reguladores atuam no citosol mantendo o potencial osmótico equilibrado, não interferindo em processos bioquímicos normais da planta (BRAY et al., 2000; MERCHANT; ADAMS, 2005).

O estresse salino afeta diretamente a produção das culturas, devido ao mal desenvolvimento, ocasionado pelo mal funcionamento dos mecanismos vitais das plantas. Entretanto, o comportamento das espécies vegetais pode variar de acordo com a cultivar e adaptabilidade da espécie. Um trabalho realizado por Medeiros et al. (2012), em tomateiro cultivado sobre diferentes concentrações de NaCl, revelou que houve diminuição da produção em relação ao aumento da concentração de sal. Porém, também em tomateiro, Ruiz et al. (2015) relacionaram o aumento da concentração de sal na água de irrigação com a espessura da pele do fruto do tomate. Os autores concluíram que houve o aumento da casca dos frutos de um dos cultivares (DRC522) o qual demonstrou também ser resistente a alta salinidade.

Um experimento realizado na cultura do milho (SUN et al., 2015), revelou que a combinação de estresse salino mais estresse hídrico apresentou respostas diferentes na atividade de metabólitos relacionados a processos fisiológicos, como fotossíntese e absorção de nutrientes. O estudo agrega novas informações valiosas sobre o comportamento da cultura submetida aos dois tipos estresses abióticos

combinados, que diferem dos dados já obtidos em trabalhos anteriores, que analisaram a cultura submetida aos estresses separadamente.

Na cultura da soja, houve um melhor esclarecimento sobre os mecanismos que estão relacionados a tolerância a salinidade. Um trabalho executado por Qiu et al. (2015), na soja 14-3-3 sob concentração elevada de sal (200 mM), revelou que a proteína SGF14c está relacionada a tolerância na cultura. A proteína foi expressa em altos índices em cultivares sal-tolerantes e induzida a ser expressa em cultivares sensíveis a alta salinidade. Os autores concluíram que o SGF14c é um novo regulador da sal tolerância e que pode ser utilizado em variedades transgênicas da soja.

Um estudo realizado em *Coffea arabica* indicou que plantas submetidas a estresse salino sofreram modificações ao nível celular. A análise de microscopia eletrônica indicou irregularidades no citoplasma e nos cloroplastos, indicando danos estruturais nas células do mesófilo. Todavia, houve aumento dos polissacarídeos na parede celular das plantas tratadas com sal comparadas a testemunha, o que indica mais uma via na defesa ao estresse salino. Os autores concluíram que o aumento dos polissacarídeos pode se tornar uma barreira para a entrada da alta concentração de Na⁺ e facilitar a passagem de outros íons regulando o estresse iônico na cultura (LIMA et al., 2014).

Uma análise proteômica (PACHECO et al., 2013), realizada nas raízes de variedades de cana-de-açúcar cultivadas sob alta concentração de sal (200 mM), revelou que a cultivar RB867515 (tolerante ao sal) acumulou maior quantidade de proteínas relacionadas a regulamentação do estresse em apenas duas horas de submissão a alta concentração de NaCl. Por outro lado, a cultivar sensível a salinidade, somente apresentou acúmulo dessas proteínas após 72 horas de estresse. No estudo foi observado que o acúmulo de proteínas é uma função da tolerância a salinidade e que sua eficácia depende da detecção precoce do estresse e da ativação da expressão dos genes responsáveis.

As plantas de citros da espécie *Fortunella crassifolia*, apresentaram a expressão do gene FcSISP ao serem submetidas a estresse salino. O gene codifica a produção de hormônios (ácido abscísico e ácido salicílico) e da atividade de prolina que estão diretamente ligados a tolerância ao sal. Gong et al. (2014) introduziram o gene em plantas de tabaco (*Nicotiana glauca*) que submetidas a estresse salino também apresentaram mecanismos de resistência, o mesmo ocorreu

para a expressão do gene em *Poncirus trifoliata*. Os dados estatísticos revelaram que o gene FcSISP está diretamente ligado a tolerância ao sal e que tem grande potencial para ser utilizado na engenharia genética.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Origem e manutenção de *Bacillus* spp.

Os ensaios foram executados no Laboratório de Microbiologia Ambiental e no setor de campos experimentais da Embrapa Meio Ambiente localizada em Jaguariúna – SP. Os isolados de *Bacillus* spp. (Tabela 1) são originários de Bettiol (1988). Todos os microrganismos foram repicados para tubos de ensaio contendo o meio batata, dextrose e ágar (BDA).

Tabela 1 – Isolados de *Bacillus* spp. utilizados na seleção bioquímica

AP01	AP55	AP108	AP164	AP287
AP02	AP56	AP109	AP167	AP297
AP03	AP59	AP110	AP173	AP302
AP06	AP60	AP111	AP181	AP312
AP07	AP61	AP113	AP183	AP323
AP08	AP63	AP114	AP186	AP324
AP11	AP64	AP115	AP188	AP325
AP12	AP70	AP117	AP189	AP326
AP14	AP76	AP119	AP192	AP328
AP15	AP74	AP120	AP193	AP329
AP20	AP77	AP121	AP198	AP332
AP21	AP79	AP123	AP203	AP338
AP22	AP80	AP124	AP204	AP339
AP23	AP82	AP130	AP209	AP340
AP25	AP85	AP131	AP210	AP343
AP26	AP86	AP135	AP212	AP345
AP27	AP87	AP137	AP213	AP346
AP29	AP88	AP138	AP214	AP349
AP31	AP89	AP140	AP216	AP350
AP38	AP90	AP142	AP219	AP365
AP39	AP91	AP143	AP227	AP420
AP40	AP92	AP144	AP229	AP503
AP41	AP93	AP147	AP239	AP504
AP42	AP94	AP148	AP251	AP505
AP43	AP95	AP150	AP254	AP507
AP44	AP97	AP151	AP262	AP508
AP46	AP100	AP152	AP268	AP509
AP48	AP101	AP153	AP275	AP511
AP49	AP104	AP159	AP276	AP512
AP51	AP105	AP162	AP281	AP519
AP54	AP106	AP165	AP284	

3.2 Seleção dos isolados por métodos qualitativos

Para a realização dos testes qualitativos, foi utilizado a concentração de 100mM de NaCl em todos os meios de cultivo, em função de selecionar os isolados de *Bacillus* que são tolerantes às condições salinas.

3.2.1 Produção de sideróforos

Os isolados de *Bacillus* (Tabela 1) foram repicados em placas de Petri e após 24 horas de crescimento foi preparada uma suspensão bacteriana com 10 mL de água destilada esterilizada. A suspensão bacteriana (5 mL) foi transferida para frascos de tampa rosqueada de 50 mL, contendo 10 mL de caldo nutriente (digestão enzimática de gelatina 62,5% e extrato de carne bovina 37,5%) suplementado com 100mM de NaCl. Posteriormente, os frascos foram mantidos a 28°C por 48 horas sob agitação constante de 120 rpm e após esse período o caldo foi centrifugado a 12.000 G por 10 minutos. Uma alíquota de 100µL do precipitado foi transferida para uma placa de microtitulação e em seguida adicionado 100µL de solução indicadora de cromo azurol S (CAS). Os isolados que apresentaram a conversão da cor azul para o amarelo foram considerados produtores de sideróforos (Figura 1) (SCHWYN; NEILANDS, 1987).

3.2.2 Produção de ácido indol acético AIA

Os isolados de *Bacillus* foram repicados em placas de Petri e após 24 horas de crescimento foi preparada uma suspensão bacteriana com 5 mL de água destilada esterilizada. Uma alíquota de 10µL foi transferida para placas de Petri 60x15 mm contendo caldo nutriente (digestão enzimática de gelatina 62,5%, extrato de carne bovina 37,5% e ágar 18,75%) suplementado com 100 mM de NaCl e 5mM de L-triptofano. Posteriormente, o meio de cultura foi coberto com membrana de nitrocelulose e incubado a 28°C por 24 horas. Após o período de incubação, as placas foram reabertas em câmara de fluxo laminar e saturadas com a solução de Salkowski. No período entre 30 minutos e 2 horas os isolados que formaram halo avermelhado na membrana foram considerados produtor de AIA (Figura 2) (BRIC et al., 1991; GORDON; WEBER, 1951).

Figura 1 – Placa de microtitulação com a reação do teste de produção de sideróforos. Os poços coloridos com a cor amarelada representam resultado positivo.

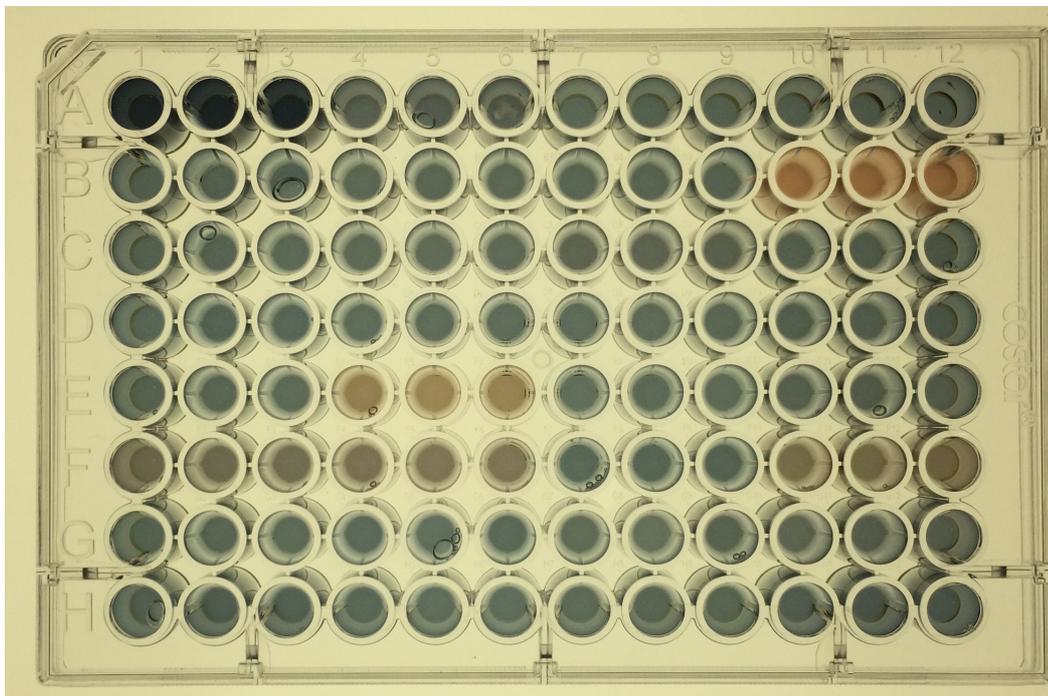
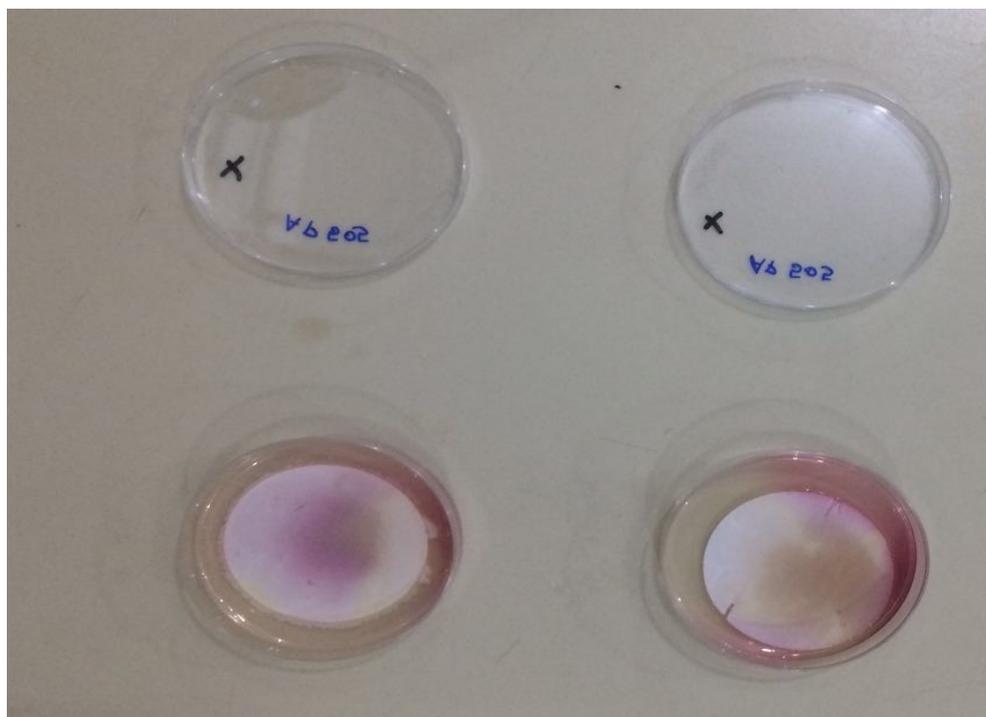


Figura 2 - Placas de Petri com a reação ao teste de produção de ácido indol acético. A mancha avermelhada sobre a membrana representa resultado positivo.



3.2.3 Fixação assimbiótica de nitrogênio

O ensaio foi executado em meio de cultura livre de nitrogênio (JNFB) semi-sólido (DOBEREINER, 1995) suplementado com 100 mM de NaCl. Os isolados de *Bacillus* foram repicados em placas de Petri e após 24 horas de crescimento foi preparada uma suspensão bacteriana com 5 mL de água destilada esterilizada. 10 µL da suspensão foram transferidos para um tubo de penicilina contendo 5 mL de JNFB e incubado a 28°C por 72 horas. Após incubação, foi considerado fixador de nitrogênio aqueles isolados que apresentaram primeiramente a mudança de coloração do meio de verde para azul, seguido do crescimento do microrganismo em forma de vortex no centro do tubo (Figura 3). Os isolados selecionados foram ainda repicados mais três vezes para novos tubos para garantir que o crescimento não estava ocorrendo às custas de outras reservas de nitrogênio (DAY; DOBEREINER, 1976).

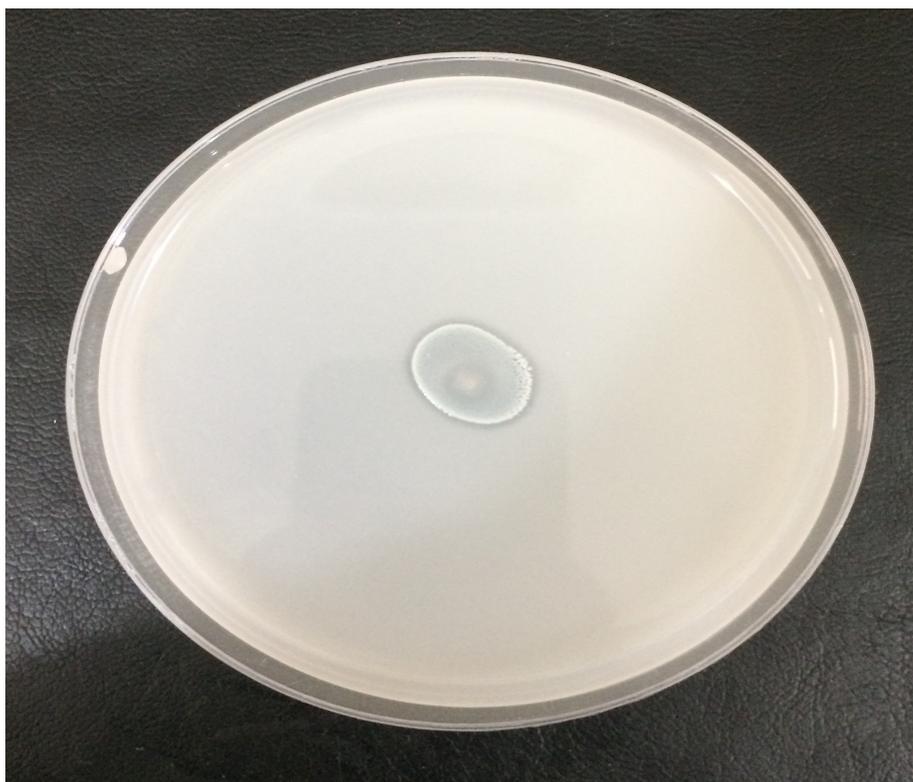
Figura 3 – Reação positiva ao teste para seleção de microrganismos fixadores de nitrogênio. Observa-se a mudança de coloração e crescimento do microrganismo em espiral no centro do tubo.



3.2.4 Solubilização de fosfato

Os isolados de *Bacillus* foram repicados em placas de Petri 60x15 mm contendo o meio de cultura NBRIP (glicose, 10g; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 5 g; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 5g; KCl, 0,2 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,25 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 g; H_2O destilada, 1000 mL.) suplementado com 100 mM de NaCl. Cada placa de Petri recebeu um isolado, o material foi incubado a 28°C por sete dias e foram considerados solubilizadores de fosfato aqueles isolados que apresentaram um halo transparente ao redor da colônia (NAUTIYAL, 1999).

Figura 4 – Formação do halo em torno da colônia bacteriana, resposta positiva ao teste de solubilização de fosfato.



3.2.5 Produção de celulase

Os isolados de *Bacillus* foram transferidos para placas de Petri 60x15 mm contendo o meio de cultura caldo nutriente suplementado com 100 mM de NaCl e 100 mM de celulose. As placas foram mantidas a 28 °C por sete dias, as colônias

que apresentaram um halo transparente ao seu redor foram consideradas solubilizadoras de celulose (SAMANTA et al., 1989).

3.2.6 Produção de catalase

Os isolados de *Bacillus* foram transferidos para tubos rosqueados de 50 mL contendo 10 mL do meio de cultura caldo nutriente, suplementado com 100 mM de NaCl, posteriormente incubados a 28 °C por 48 h sob agitação de 120 rpm. Após incubação o material foi centrifugado a 12.000 g por 10 minutos, sendo transferido 100µL do sobrenadante para uma placa de microtitulação, logo após foi adicionado 100µL de peróxido de hidrogênio para cada poço. Foram considerados microrganismos produtores de catalase aqueles que apresentaram a produção de bolhas de gás (oxigênio livre) (BUENO et al., 2009).

3.3 Promoção de crescimento do tomateiro

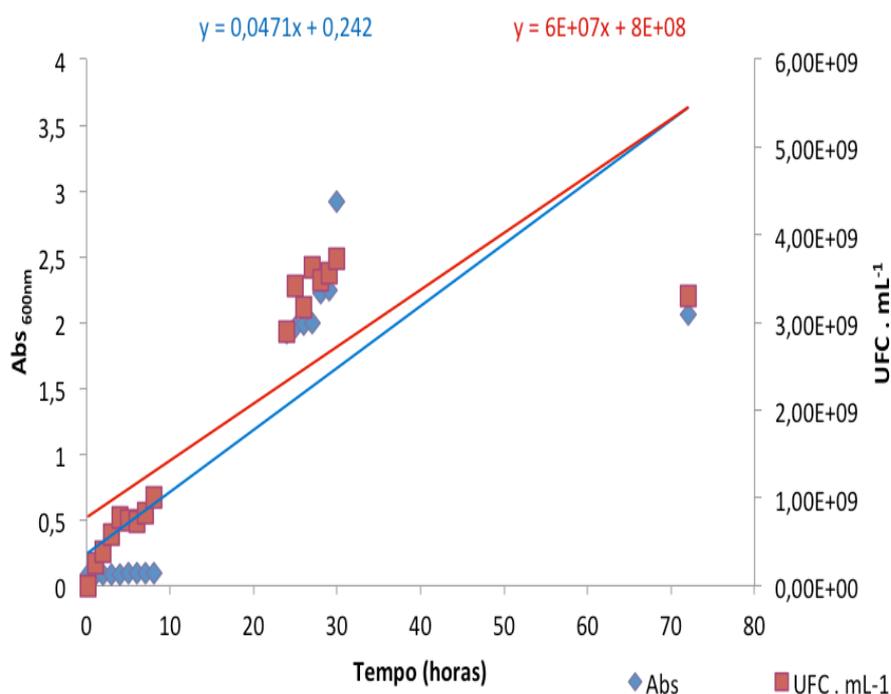
Neste ensaio foram utilizados cinco isolados (AP03, AP06, AP85 e AP100) de *Bacillus* que apresentaram ao menos quatro respostas positivas aos testes bioquímicos descritos anteriormente e, como padrão, o isolado de *Bacillus subtilis* QST-713 (Serenade®).

3.3.1 Preparo da suspensão bacteriana

Para o preparo da suspensão, os isolados de *Bacillus* selecionados foram repicados a partir da amostra de trabalho em tubos de ensaio, para placas de Petri com nutriente ágar. Após incubação por 48 horas a 28 °C foi preparada uma suspensão bacteriana com 10 mL de água destilada esterilizada. Uma alíquota de 5 ml dessa suspensão foi transferida para Erlenmeyer contendo 45 mL de caldo nutriente, em seguida foi incubada sob agitação a 28 °C. Após 48 horas de crescimento, as suspensões foram ajustadas para a concentração de 1×10^8 (0,245 nm) UFC/mL com o auxílio do espectrofotômetro utilizando a curva padrão de concentração (Figura 5). Para o uso do Serenade®, produto comercial à base de *Bacillus subtilis*, foi realizada uma diluição de 1 mL do produto para 9mL de água

destilada esterilizada com a finalidade de se obter uma concentração de 1×10^8 UFC/mL.

Figura 5 – Curva obtida para realizar a calibração de concentração de *Bacillus* spp. com o uso do isolado AP3.



3.3.2 Tratamento das sementes e semeadura

No ensaio foram utilizadas 120 sementes de tomate (var. Santa Clara) para cada isolado de *Bacillus*, incluindo o controle. As sementes foram depositadas em tubos de ensaio com 5 mL de hipoclorito de sódio (2%). Posteriormente, foram mantidas sob agitação por 10 minutos, em seguida lavadas em água destilada esterilizada quatro vezes e secadas dentro da câmara asséptica sob papel filtro esterilizado. Após secagem, as sementes foram colocadas em placas de Petri abertas e cobertas com 2 mL das suspensões bacterianas. Após a secagem (24 horas) foram semeadas em bandeja de 125 alvéolos para cada tratamento. As sementes do tratamento controle (testemunha) foram mantidas pelo mesmo tempo em 2 mL de água esterilizada. As mudas foram transplantadas 20 dias depois da emergência para vasos, sendo três mudas por vaso e sendo desbastada uma após três dias.

3.3.3 Preparo do substrato

O solo foi peneirado e depositado no coletor solar por 24 horas, em seguida foi misturado com substrato comercial (Multiplant[®]) na proporção de 3:1, respectivamente. Foi realizada a adubação com a fórmula comercial de NPK (Vitaplan[®], 10-10-10), na proporção de 5g/L, o substrato foi distribuído em volumes iguais em vasos de 3 L. Todos os vasos foram pesados individualmente para a garantia que cada um tivesse 3 kg da mistura de solo e substrato.

3.3.4 Determinação da altura, diâmetro das hastes, concentração de clorofila, massa fresca e seca e enzimas das plantas

Aos 27, 34 e 41 dias do transplante foram realizadas avaliações da altura e diâmetro das hastes das plantas, também a concentração de clorofila. No final do ensaio foram determinados os pesos das matérias frescas e secas da parte aérea e das raízes. As metodologias estão descritas no item 3.7. Também foram avaliadas as enzimas que estão descritas no item 3.8.

3.4 Indução de resistência ao estresse salino

O ensaio foi executado utilizando a mesma metodologia descrita para o ensaio de promoção de crescimento em relação ao tratamento de sementes, semeadura, isolados bacterianos e preparo do solo. Todavia, foram preparados o dobro de repetições, para que metade fosse submetida ao estresse salino. Todos os vasos receberam semanalmente uma alíquota de 5 mL (1×10^8 UFC/mL) de *Bacillus* correspondente por planta, com exceção das testemunhas. As plantas foram submetidas inicialmente a concentração de 200 mM de NaCl, todavia devido ao estresse oxidativo elevado, não foi possível realizar as avaliações depois de sete dias após o transplante, pois as plantas apresentavam alto nível de fitotoxicidade. Desta forma, o experimento foi repetido com a mesma metodologia, mas utilizando a concentração de 100 mM de NaCl.

As plantas de tomate foram estressadas aplicando uma solução de 100 mM de NaCl no substrato. Para manter esta concentração, foi calculada a capacidade de

retenção de água dos vasos (LUCAS et al., 2011). A partir deste cálculo foram mantidos em cada vaso 75% da capacidade de campo, os vasos foram pesados diariamente e individualmente para garantir que a concentração fosse semelhante entre todos. Os vasos que não foram submetidos ao estresse com NaCl, foram irrigados com água com condutividade elétrica de $1,2 \text{ dS/m}^{-1}$.

As avaliações foram semelhantes às descritas para o estudo de promoção de crescimento.

3.5 Eficiência de *Bacillus* no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Neste ensaio foram utilizados os isolados AP03, AP06, AP85 e AP100 que apresentaram ao menos quatro respostas positivas aos testes bioquímicos e o isolado de *Bacillus subtilis* QST-713 (Serenade®).

Para a execução deste ensaio, foi utilizado o isolado 149 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3, proveniente da coleção de fitopatógenos da Sakata Seeds. O isolado foi cultivado em meio de cultura seletivo (NASH; SNYDER, 1962) depositados em Erlenmeyer de 500 mL, incubados a 25°C por cinco dias sob agitação constante. Após a incubação a concentração foi ajustada para 2×10^5 conídios/mL utilizando a câmara Neubauer.

O solo deste ensaio foi depositado em coletor solar por 24 horas, posteriormente foi misturado com substrato comercial (Multiplant®) na proporção de 3:1, respectivamente. A adubação foi realizada com a fórmula comercial de NPK (Vitaplan®, 10-10-10), na proporção de 5g/L. O substrato foi infestado com uma suspensão de 2×10^5 conídios/mL do isolado 149 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3, para isso, a solução foi diluída e irrigada sob o substrato espalhado em lona plástica esterilizada. Após uma hora, o substrato infestado foi distribuído igualmente em vasos com volume de 700 mL, todos os vasos foram pesados individualmente para a garantia que cada um tivesse 0,5 kg de solo/substrato.

Foram utilizadas para este ensaio sementes de tomate (var. Santa Clara), semeadas em bandejas de 120 alvéolos, as bandejas foram irrigadas até a emergência com suspensão bacteriana diluída em água na concentração de 1×10^8 de UFC/mL, preparada com a mesma metodologia que o ensaio de promoção de crescimento. Após emergência as mudas foram transplantadas, três por vaso, em dez repetições, sendo desbastada uma após o terceiro dia. Todos os vasos

receberam semanalmente a alíquota de 5 mL (1×10^8 UFC/mL) de seu tratamento de *Bacillus* correspondente por planta, em exceção as testemunhas.

A severidade da doença foi avaliada 30 dias após o transplante, com o auxílio de duas escalas de notas. Os sintomas externos foram avaliados inicialmente, com as seguintes notas: 1- planta sem sintoma; 2 – planta com amarelecimento até a segunda folha; 3 – planta com amarelecimento até a terceira folha; 4 – planta murcha e sem amarelecimento; 5 – planta com murcha e amarelecimento, e 6 – Planta morta. Para a avaliação dos sintomas internos, foram utilizadas as seguintes notas: 1- planta sem escurecimento dos vasos; 2 – planta com escurecimento dos vasos até a altura da primeira folha; 3 – planta com escurecimento dos vasos até a segunda folha; 4 – planta com escurecimento dos vasos até a terceira folha; 5 – planta com escurecimento dos vasos até a metade do comprimento do caule, e 6 – planta com escurecimento até próximo do ponteiro. (TOKESHI; GALLI, 1966; SANTOS, 2000).

3.6 Eficiência de *Bacillus* no controle de *Oidium*

O ensaio foi executado utilizando a mesma metodologia do ensaio de promoção de crescimento em relação ao tratamento de sementes, semeadura, isolados bacterianos e preparo do solo.

Para a execução deste ensaio, foi utilizado o isolado de *Oidium* sp., proveniente da coleção de fitopatógenos da Sakata Seeds. Plantas de tomateiro com oídio foram mantidas próximas às plantas tratadas com os isolados de *Bacillus* para que ocorresse a dispersão dos conídios do Oídio de forma natural. Todas as plantas receberam semanalmente a alíquota de 5 mL (1×10^8 UFC/mL) de seu tratamento de *Bacillus* correspondente, exceto as testemunhas, até o dia da transferência dessas plantas para casa de vegetação com as plantas doentes. Os vasos com as plantas testemunhas que não receberam a inoculação do patógeno, foram mantidos em casa de vegetação separada para posterior avaliação.

A avaliação foi executada determinando-se a porcentagem de tecido foliar coberto pelo patógeno, sendo iniciada a partir da aparição das primeiras colônias na superfície das folhas (BETTIOL et al., 1997).

3.7 Parâmetros biométricos

3.7.1 Altura, diâmetro da haste, teor de clorofila e massa verde e seca da parte aérea e da raiz das plantas

Determinou-se a altura das plantas em cm, com o auxílio de trena graduada. A medida corresponde a altura entre o colo da planta a partir do solo e o ápice da parte aérea. O diâmetro correspondeu à medida da haste das plantas na altura das primeiras folhas, foi determinado em mm com o auxílio de paquímetro digital, modelo WESTER DC-60. O teor de clorofila foi determinado através do clorofilômetro Soil Plant Analysis Development (SPAD-502). Foram executadas cinco leituras no primeiro folíolo, uma em cada folha e posteriormente foram calculadas as médias. As plantas foram seccionadas a partir da base do caule separando a parte aérea das raízes, ambas foram pesadas individualmente e postas para secagem em estufa com circulação de ar forçada a 65°C durante sete dias. Após secagem, os materiais vegetais foram pesados novamente para o registro da massa seca.

3.8 Determinação da atividade enzimática

3.8.1 Coleta e armazenagem do material vegetal e obtenção do extrato bruto

Cinco folhas de cada as repetição dos seus respectivos tratamentos foram coletadas. Os tecidos, assim que separados das plantas, foram colocados em envelopes de papel alumínio e mergulhados em nitrogênio líquido. Posteriormente, foram armazenados em Freezer a -80°C. O extrato foi preparado adicionando 1g do material vegetal em almofariz com nitrogênio líquido, triturando até obter um pó fino. Posteriormente, foi adicionado 6 mL de solução tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,5 com polivinilpirrolidona 1% (p/v) e fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF). A solução foi centrifugada a 12000 G, 4°C por 20 minutos, os sobrenadantes foram armazenados em eppendorff e incubados a 80°C até a análise.

3.8.2 Determinação da atividade de proteínas totais

Adicionou-se 20 µL de extrato bruto em relação a 200 µL de solução de Bradford, e realizou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 595 nm, após 30 minutos da adição da solução. Utilizou-se o programa Magellan e os dados foram comparados com a curva-padrão feita previamente e a concentração foi expressa em mg mL⁻¹ de proteína (BRADFORD, 1976).

3.8.3 Determinação da atividade de fenilalanina amônia-liase (FAL)

O extrato bruto foi centrifugado a 18000 G, na temperatura de 4°C por 20 minutos, foi coletado uma alíquota de 50µL e misturada a 270 µL de tampão borato 100 mM (pH 8,8) e 270 µL de L-fenilalanina 12 mM em tampão borato. O material foi levado a banho maria por 20 minutos a 35°C, logo após foi adicionado 20 µL de HCl 6N e realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 290 nm. As leituras foram comparadas com a curva padrão feita previamente, e a atividade da enzima foi determinada em µg ácido trans cinâmico.mg⁻¹ proteína. Min⁻¹(PASCHOLATI et al., 1986; CAKIR; SULE, 2009).

3.8.4 Determinação da atividade de polifenoloxidase (PPO)

Na determinação da atividade da enzima, utilizou-se 200 µL de pirocatequina a 20 mM diluída em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 6,8, e 20 µL de extrato. Realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 420 nm, em 10 ciclos de 1 minuto, a 30°C no software Magellan (versão Standard). Utilizou-se a subtração entre a última e a primeira leitura para a determinação da atividade, expressa em unidades de PPO mg⁻¹ tecido min⁻¹, definindo-se uma unidade como um incremento de absorbância de 0,001 por minuto de reação por mg de tecido vegetal (DUANGMAL; APENTEN, 1999).

3.8.5 Determinação da atividade de peroxidase (PO)

A atividade da enzima foi determinada misturando-se 10 µL do extrato com 90 µL de tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹, pH 6,5, 90 µL de peróxido de hidrogênio 3 mmol L⁻¹ e 90 µL de guaiacol 15 mmol L⁻¹. A leitura foi realizada no software Magellan utilizando-se 10 ciclos de 30 segundos, a 30° C. Determinou-se a atividade

em unidades de PO $\text{mg}^{-1}_{\text{tecido}} \text{min}^{-1}$, definiu-se uma unidade como um incremento de absorvância de 0,01 por minuto de reação por mg de tecido (HAMMERSCHMIDT et al, 1982 ; HALFELD-VIEIRA et al., 2006).

3.9 Determinação do teor de L-prolina

Para a avaliação da indução de resistência ao estresse salino, foi necessário verificar a atividade do osmolito L-prolina nas plantas tratadas com os isolados de *Bacillus* e nas testemunhas. A coleta e armazenagem do material vegetal foram realizados de forma semelhante a determinação da atividade enzimática. Para a formação do extrato bruto, misturou-se 50 g de peso fresco com 1 mL de etanol:H₂O (40:60 v/v). A mistura resultante foi armazenada durante a noite a 4°C, posteriormente foi centrifugada a 14.000 G por 5 minutos. Para a reação utilizou-se placa de microtitulação, pipetando-se 50 μL do extrato e logo após 100 μL da mistura reacional de ninidrina 1% (p/v) em ácido acético 60% (v/v) e etanol 20% (v/v). A placa foi selada e aquecida a 95°C por 20 minutos, posteriormente foi esfriada a temperatura ambiente e centrifugada a 14.000 G por 5 minutos, 100 μL foi transferido para uma nova placa, a leitura foi realizada a 520 nm em leitor de microplacas. O teor de L-prolina foi expresso em $\mu\text{mol g de tecido}^{-1}$ (BATES, 1973).

3.10 Delineamento experimental

Para a execução dos testes qualitativos utilizou-se sempre o número de 5 repetições, avaliando-se em seguida o resultado em positivo e negativo.

Para o experimento de promoção de crescimento foi adotado o delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições e cinco bactérias promotoras de crescimento (AP3, AP6, AP85, AP100 e QST713) e uma testemunha. O ensaio de estresse salino foi executado em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial duplo (6x2).

Na avaliação da eficiência contra *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, o delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, com cinco repetições e os mesmos tratamentos dos ensaios anteriores. Foram utilizadas duas testemunhas, uma para controle do patógeno sem a submissão aos tratamentos e outra sem o patógeno e submetida aos tratamentos. As avaliações dos parâmetros biométricos se iniciaram após a primeira semana do transplante e se encerraram na

quarta semana, as de severidade tiveram início após quatro semanas do transplante e se encerraram na sétima semana.

Na avaliação da eficiência contra *Oidium* sp, o delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, com cinco repetições e os mesmos tratamentos dos ensaios anteriores. Foram utilizadas duas testemunhas, uma para controle do patógeno sem a submissão aos tratamentos e outra sem o patógeno e submetida aos tratamentos. A avaliação de severidade ocorreu após quatro semanas do transplante.

Todos os ensaios foram repetidos duas vezes e os dados avaliados submeteram-se a análise de variância ($F \leq 0,05$) e as medias foram submetidas ao teste de Tukey ($P \leq 0,05$), onde utilizou-se o software estatístico R versão 3.3.2.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Seleção dos isolados de *Bacillus* spp.

Os seis testes bioquímicos permitiram a seleção de quatro isolados (AP3, AP6, AP85 e AP100), dos 154 isolados testados. Esses isolados apresentaram resultados positivos em ao menos quatro dos testes submetidos (Tabela 2). O teste de produção da enzima catalase apresentou o maior número de resultados positivos (35%), seguido aos testes de produção de sideróforos (26%), fixação de nitrogênio (19%) e produção de ácido indol acético (18%). Nos testes de solubilização de fosfatos e produção da enzima celulase apenas 1% apresentaram respostas positivas (Figura 6).

Tabela 2 – Resultados dos testes bioquímicos (ácido indol acético – AIA, sideróforos, solubilização de fosfato, fixação assimbiótica de nitrogênio-FAN, catalase e celulase) para os isolados de *Bacillus* spp

Isolados	AIA	Sideróforo	Fosfato	FAN	Catalase	Celulase
AP1	N	P	N	P	P	N
AP2	N	N	N	P	P	N
AP3	P	P	N	P	P	N
AP6	P	N	P	N	P	P
AP7	N	N	N	N	P	N
AP8	N	N	N	N	P	N
AP11	P	P	N	P	P	N
AP12	N	N	N	N	P	N
AP14	N	N	N	N	P	N
AP15	N	N	N	N	P	N
AP20	N	N	N	N	P	N
AP21	N	N	N	N	P	N
AP22	N	N	N	N	P	N
AP23	N	N	N	N	P	N
AP25	N	N	N	N	P	N
AP26	P	P	N	P	P	N
AP27	P	P	N	P	P	N
AP29	N	N	N	N	P	N
AP31	N	N	N	N	P	N
AP38	P	P	N	P	P	N
AP39	N	N	N	N	N	N
AP40	P	P	N	P	N	N
AP41	N	N	N	N	N	N
AP42	N	N	N	N	N	N
AP43	N	N	N	N	N	N
AP44	N	N	N	N	N	N

AP46	N	N	N	N	N	N
AP48	N	N	N	N	N	N
AP49	N	N	N	N	N	N
AP51	N	N	N	N	N	N
AP54	N	N	N	N	N	N
AP55	N	N	N	N	N	N
AP56	N	N	N	N	N	N
AP59	N	N	N	N	N	N
AP60	N	N	N	N	N	N
AP61	N	N	N	N	N	N
AP63	N	N	N	N	N	N
AP64	N	N	N	N	N	N
AP70	N	N	N	N	N	N
AP76	N	N	N	N	N	N
AP74	N	N	N	N	N	N
AP77	N	N	N	N	N	N
AP79	N	N	N	N	N	N
AP80	N	N	N	N	N	N
AP82	N	N	N	N	N	N
AP85	P	P	P	N	P	N
AP86	P	P	N	P	P	N
AP87	P	P	N	P	P	N
AP88	P	P	N	P	P	N
AP89	P	P	N	P	P	N
AP90	P	P	N	P	P	N
AP91	P	P	N	P	N	N
AP92	P	P	N	P	N	N
AP93	N	N	N	P	N	N
AP94	N	N	N	N	N	N
AP95	N	N	N	N	N	N
AP97	N	N	N	N	N	N
AP100	P	P	N	P	N	P
AP101	N	N	N	N	P	N
AP104	N	N	N	N	P	N
AP105	N	N	N	N	P	N
AP106	N	N	N	N	P	N
AP108	N	N	N	N	P	N
AP109	N	N	N	N	P	N
AP110	N	N	N	N	P	N
AP111	N	N	N	N	P	N
AP113	N	N	N	N	P	N
AP114	N	N	N	N	P	N
AP115	N	N	N	N	P	N
AP117	N	N	N	N	P	N
AP119	N	N	N	N	P	N
AP120	N	N	N	N	P	N

AP121	N	N	N	N	P	N
AP123	N	N	N	N	P	N
AP124	N	N	N	N	N	N
AP130	N	N	N	N	N	N
AP131	N	N	N	N	N	N
AP135	N	N	N	N	N	N
AP137	N	N	N	N	N	N
AP138	N	N	N	N	N	N
AP140	N	N	N	N	N	N
AP142	N	N	N	N	N	N
AP143	N	N	N	N	N	N
AP144	N	N	N	N	N	N
AP147	N	N	N	N	N	N
AP148	N	N	N	N	N	N
AP150	N	N	N	N	N	N
AP151	N	N	N	N	N	N
AP152	N	N	N	N	P	N
AP153	N	N	N	N	P	N
AP159	N	N	N	N	P	N
AP162	N	N	N	N	P	N
AP165	N	N	N	N	P	N
AP164	N	N	N	N	P	N
AP167	N	N	N	N	P	N
AP173	N	N	N	N	P	N
AP181	N	N	N	N	P	N
AP183	N	N	N	N	P	N
AP186	N	N	N	N	P	N
AP188	N	N	N	N	P	N
AP189	N	N	N	N	P	N
AP192	P	P	N	P	P	N
AP193	P	P	N	P	P	N
AP198	P	P	N	P	P	N
AP203	P	P	N	P	P	N
AP204	P	P	N	P	P	N
AP209	N	P	N	N	N	N
AP210	N	P	N	N	N	N
AP212	N	P	N	N	N	N
AP213	N	P	N	N	N	N
AP214	N	P	N	N	N	N
AP216	N	P	N	N	N	N
AP219	N	P	N	N	N	N
AP227	N	P	N	N	N	N
AP229	N	P	N	N	N	N
AP239	N	P	N	N	N	N
AP251	N	P	N	N	N	N
AP254	N	P	N	N	N	N

AP262	N	P	N	N	N	N
AP268	N	N	N	N	N	N
AP275	N	N	N	N	N	N
AP276	N	N	N	N	N	N
AP281	N	N	N	N	N	N
AP284	N	N	N	N	N	N
AP287	N	N	N	N	N	N
AP297	N	N	N	N	N	N
AP302	N	N	N	N	N	N
AP312	N	N	N	N	N	N
AP323	N	N	N	N	N	N
AP324	N	N	N	N	N	N
AP325	N	N	N	N	N	N
AP326	N	N	N	N	N	N
AP328	N	N	N	N	N	N
AP329	N	N	N	N	N	N
AP332	N	N	N	N	N	N
AP338	N	N	N	N	N	N
AP339	N	N	N	N	N	N
AP340	N	N	N	N	N	N
AP343	N	N	N	N	N	N
AP345	N	N	N	N	N	N
AP346	N	N	N	N	N	N
AP349	N	N	N	N	N	N
AP350	N	N	N	N	N	N
AP365	N	N	N	N	N	N
AP420	N	N	N	N	N	N
AP503	P	P	N	P	N	N
AP504	P	P	N	P	N	N
AP505	P	P	N	P	N	N
AP507	P	P	N	P	N	N
AP508	P	P	N	P	N	N
AP509	P	P	N	P	N	N
AP511	N	N	N	P	N	N
AP512	N	N	N	N	N	N
AP519	N	N	N	N	N	N

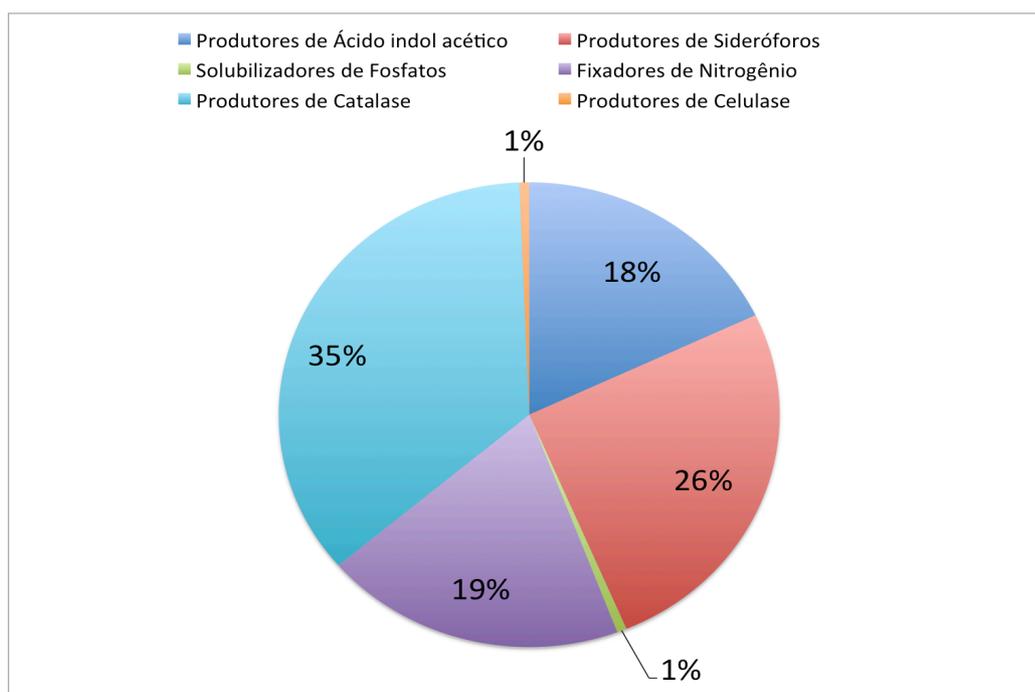
P: positivo; N: negativo

De acordo com Manjula e Podile (2005), as bactérias promotoras de crescimento, grupo ao qual o gênero *Bacillus* está incluso, apresentam respostas positivas quanto aos testes de produção de sideróforos, fixação assimbiótica de nitrogênio, produção de catalase e produção de AIA. Este fato está associado com a capacidade de sobrevivência destes microrganismos em condições adversas.

Francis et al. (2010) explicam que produtores sideróforos são capazes de sequestrar o Fe disponível no solo o que é uma característica essencial para bactérias competidoras em determinados nichos ecológicos. A produção de AIA e a fixação de nitrogênio indicam características bioquímicas essenciais para microrganismos que mantêm uma relação simbiótica com as plantas (LUGTENBERG; KAMILOVA, 2009).

A solubilização de fosfato e a degradação de celulose também são características importantes para agentes de controle biológico, todavia para a detecção de tais fatores pode ser necessário maior precisão e aprofundamento na metodologia. Isso pode ocorrer devido a variabilidade do meio de cultura, pH, salinidade e outras características físico químicas. Souchie et al. (2007) observaram que fungos e bactérias isolados do solo apresentaram resposta positiva para a solubilização de fosfatos em meio sólido, em contrapartida outros microrganismos isolados do mesmo sítio apresentaram a característica apenas em meio líquido. Balaraju et al. (2010) observaram que a temperatura, concentração de inóculo e pH também influenciaram na produção de celulase.

Figura 6 – Percentagem de respostas positivas para os isolados de *Bacillus* aos testes bioquímicos.



4.2 Promoção de crescimento do tomateiro

A análise de variância para a variável altura (Tabela 3) apresentou diferença significativa entre os tratamentos e a testemunha nos três períodos de avaliação. O isolado AP100 de *Bacillus* foi o que proporcionou o maior crescimento aos 41 DAS. É importante considerar que o coeficiente de variação para as três datas foram abaixo de 17%. Para as três datas avaliadas, o diâmetro das plantas foi estatisticamente superior à testemunha para todos os isolados de *Bacillus* spp. estudados. A variável diâmetro (Tabela 4) foi maior para os tratamentos com os isolados AP3, AP6, AP85 e AP100 aos 27 dias após a semeadura (DAS). Aos 34 DAS o isolado AP85 apresentou valores maiores, seguido dos isolados AP3, AP6 e AP100. Por outro lado, o isolado QST-713, que apresentou valores menores, diferiu estatisticamente da testemunha. Aos 41 DAS os tratamentos apresentaram diferença significativa em relação à testemunha, não diferindo estatisticamente entre si. O coeficiente de variação para o diâmetro foi abaixo de 14,5% para todas as datas avaliadas.

Tabela 3 – Efeito dos tratamentos das sementes de tomateiro com isolados de *Bacillus* spp. sobre a altura das plantas aos 27, 34 e 41 dias após a semeadura (DAS) no ensaio de promoção de crescimento

Isolado	Altura (cm)		
	27 DAS	34 DAS	41 DAS
AP3	12,40* a	23,61 a	51,38 a
AP6	12,83 a	23,83 a	49,80 a
AP85	12,95 a	23,24 a	51,08 a
AP100	12,17 a	23,04 a	54,77 a
QTS-713	11,69 a	22,32 a	50,26 a
Testemunha	7,35 b	13,79 b	35,43 b
CV (%)	12,78	16,58	14,88

*Na coluna, médias seguidas com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Tabela 4- Efeito dos tratamentos das sementes de tomateiro com isolados de *Bacillus* spp. sobre o diâmetro das plantas aos 27, 34 e 41 dias após a semeadura (DAS) no ensaio de promoção de crescimento

Isolados	Diâmetro (mm)		
	27 DAS	34 DAS	41 DAS
AP3	3,74* a	6,01ab	7,84 a
AP6	3,48 a	5,84ab	7,42 a
AP85	3,71 a	6,34 a	7,55 a
AP100	3,78 a	5,82ab	7,55 a
QTS-713	3,22ab	5,35b	7,06 a
Testemunha	2,67 b	3,60c	4,19 b
CV (%)	14,39	11,76	13,78

*Na coluna, medias seguidas com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Em relação ao teor de clorofila (Tabela 5), houve um aumento em todos os tratamentos em relação à testemunha, nos três períodos analisados. É importante considerar que o coeficiente de variação foi abaixo de 10% para todas as datas. Além disso, não ocorreu uma variação grande entre as datas estudadas.

A análise de variância apresentou resultados de diferença significativa para o peso fresco da parte aérea (Tabela 6). O isolados AP3, AP6, AP85 e AP100 estimularam o maior acúmulo de massa, diferindo do tratamento QTS-713 e da testemunha. Os isolados AP6 e AP85 apresentaram as maiores massas secas, seguidos dos isolados AP3 e AP100. O isolado QTS-713 e a testemunha apresentaram os menores valores (Tabela 6).

Para o peso fresco da raiz (Tabela 6) os resultados foram semelhantes a massa fresca da parte aérea. Os isolados AP3, AP6, AP85 e AP100 apresentaram um maior acúmulo de massa. Todavia, para essa variável, houve diferença significativa entre o isolado QTS-713 e a testemunha. Na variável peso seco da raiz, o isolado AP3 apresentou maior acúmulo de massa, seguido do AP100. Os isolados AP6, AP85 e QTS-713 permaneceram com menores pesos, entretanto, foram diferentes estatisticamente da testemunha.

Analisando os parâmetros biométricos em conjunto, é possível afirmar que os isolados de *Bacillus* spp. selecionados foram capazes de promover crescimento nas plantas de tomate (Figura 7), pois estimularam as variáveis altura, diâmetro e peso

seco (parte aérea e raiz) em relação à testemunha. Isso indica que houve um crescimento absoluto maior nas plantas tratadas com *Bacillus* spp. Resultados semelhantes também foram observados por Abdallah et al. (2016) em tomateiros cultivados em casa de vegetação e Jasim et al. (2015) no crescimento de plantas medicinais. Possivelmente, a produção de fitohormônios e a fixação de nutrientes, revelados inicialmente na seleção bioquímica, estão diretamente ligados na promoção de crescimento, caso observado em outros estudos (WANG et al., 2014; KANG et al., 2014).

É importante destacar que o aumento nos teores de clorofila indica que há uma relação benéfica e não patogênica entre planta e bactéria, o aumento na variável raiz também indica que as bactérias estão colonizando as raízes, o que aumenta a atividade fotossintética e fixação de nutrientes, promovendo crescimento (LIMA et al., 2016).

Tabela 5 – Efeito dos tratamentos das sementes de tomateiro com isolados de *Bacillus* spp. sobre o teor de clorofila aos 27, 34 e 41 dias após a semeadura (DAS) no ensaio de promoção de crescimento

Isolados	Índice de clorofila (Unidade SPAD)		
	27 DAS	34 DAS	41 DAS
AP3	29,33* a	29,68 a	33,43 a
AP6	31,47 a	30,75 a	34,24 a
AP85	32,34 a	30,09 a	33,81 a
AP 100	31,59 a	30,16 a	33,95 a
QTS-713	32,61 a	31,25 a	33,92 a
Testemunha	25,42 b	24,00 b	23,83 b
CV(%)	8,98	9,7	8,4

*Na coluna, medias seguidas com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Tabela 6 - Efeito dos tratamentos das sementes de tomateiro com isolados de *Bacillus* spp. sobre o peso fresco e seco da parte aérea e raiz no ensaio de promoção de crescimento

Isolados	Peso fresco parte aérea (g)	Peso seco parte aérea (g)	Peso fresco raiz (g)	Peso seco raiz(g)
AP3	75,5* a	6,3 b	12,31 a	1,79 a
AP6	71,93 a	7,65 a	13,32 a	1,35 b
AP85	73,24 a	7,54 a	11,84 a	1,39 b
AP100	73,28 a	5,89 b	12,63 a	1,45 ab
QTS-713	49,87 b	4,74 c	9,24 b	1,12 b
Testemunha	36,89 b	2,92 d	5,65 c	0,68 c
CV(%)	16,68	10,06	15,05	19,93

*Na coluna, medias seguidas com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Não foram observadas diferenças significativas entre os valores da enzima PO quando comparados os isolados entre si, diferindo apenas da testemunha, que apresentou a menor atividade da enzima (Figura 8). Para PPO (Figura 9), os isolados AP100 e QST-713 nas plantas tratadas apresentaram os melhores resultados, seguido dos isolados AP85, AP3 e AP6, a testemunha obteve o menor teor da enzima na planta. Para a enzima FAL foi observada uma maior atividade nas plantas tratadas com as bactérias AP3 e AP85. Os isolados AP6, AP100 e QST-713 apresentaram valores menores, porém diferiram estatisticamente da testemunha (Figura 10).

Os dados revelaram que o tratamento com os isolados de *Bacillus* elevaram o teor das enzimas nas plantas, isso indica a ativação dos mecanismos de indução de resistência, sendo o mesmo observado por Babu et al. (2015), também em tomateiro. A elevação do teor enzimático indica que essa via de defesa também está relacionada com o desenvolvimento da planta, no que se refere ao aumento da altura, diâmetro e massa seca. Isso também expressa que as bactérias selecionadas são promissoras para o manejo de doenças e estresse abiótico (ZWICK et al., 2016). Neste experimento as plantas não foram submetidas a nenhum tipo de estresse biótico e abiótico, todavia, o teor das enzimas foi maior nas plantas tratadas com as bactérias, desta forma as células do tomateiro perceberam a presença da bactéria como o sinal na ativação da indução de resistência (Figura 10) (ONGENA et al., 2007).

Figura 7 – Efeito dos tratamentos das sementes de tomateiro com isolados de *Bacillus* spp. sobre o crescimento das plantas.

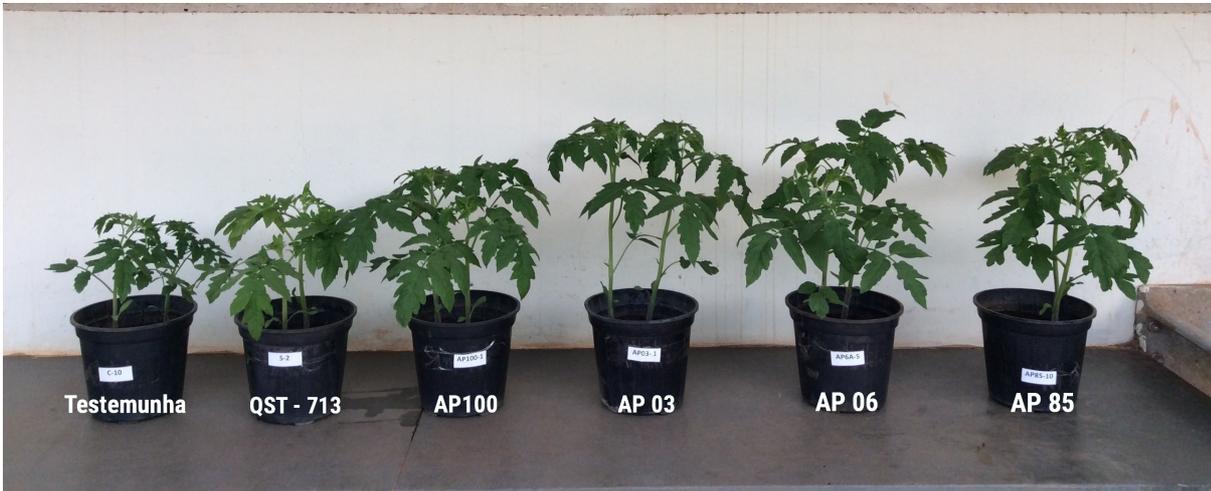


Figura 8 – Efeito dos tratamentos das sementes de tomateiro com isolados de *Bacillus* spp. sobre o teor da enzima peroxidase nas plantas.

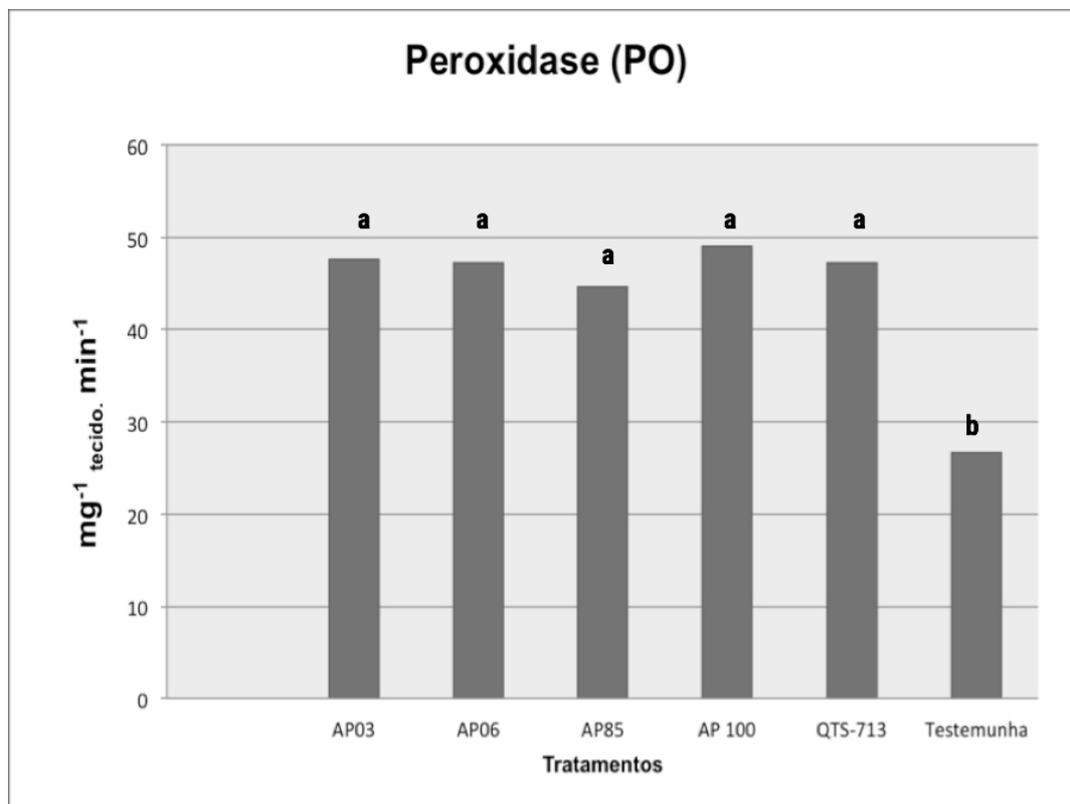


Figura 9 – Efeito dos tratamentos das sementes de tomateiro com isolados de *Bacillus* spp. sobre o teor da enzima polifenoloxidase nas plantas.

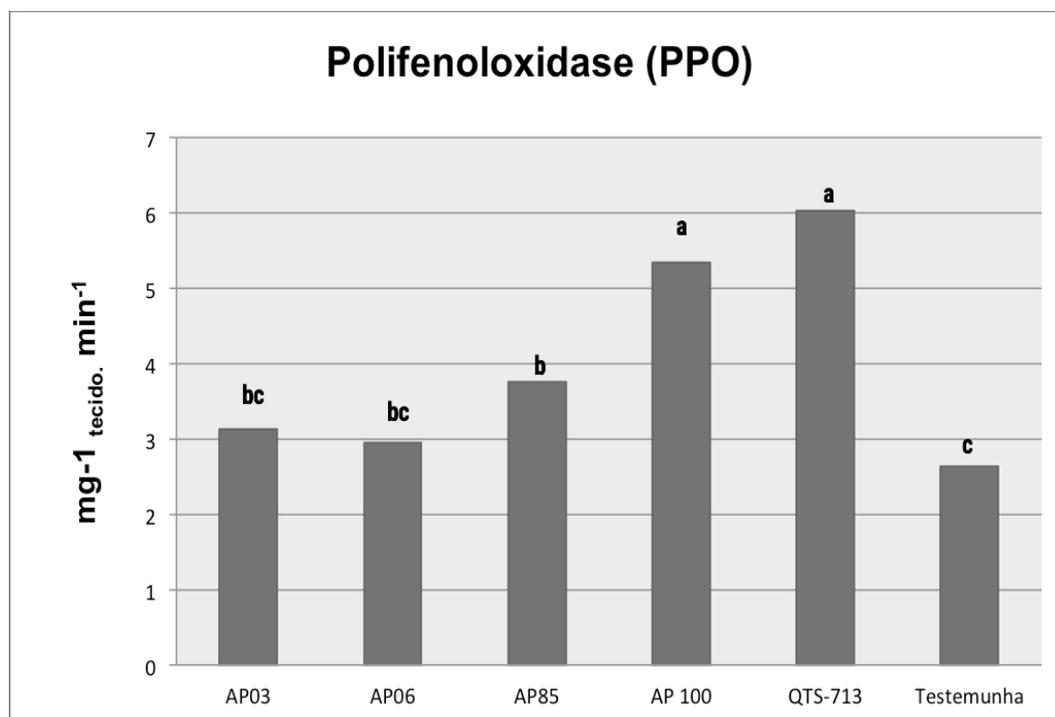
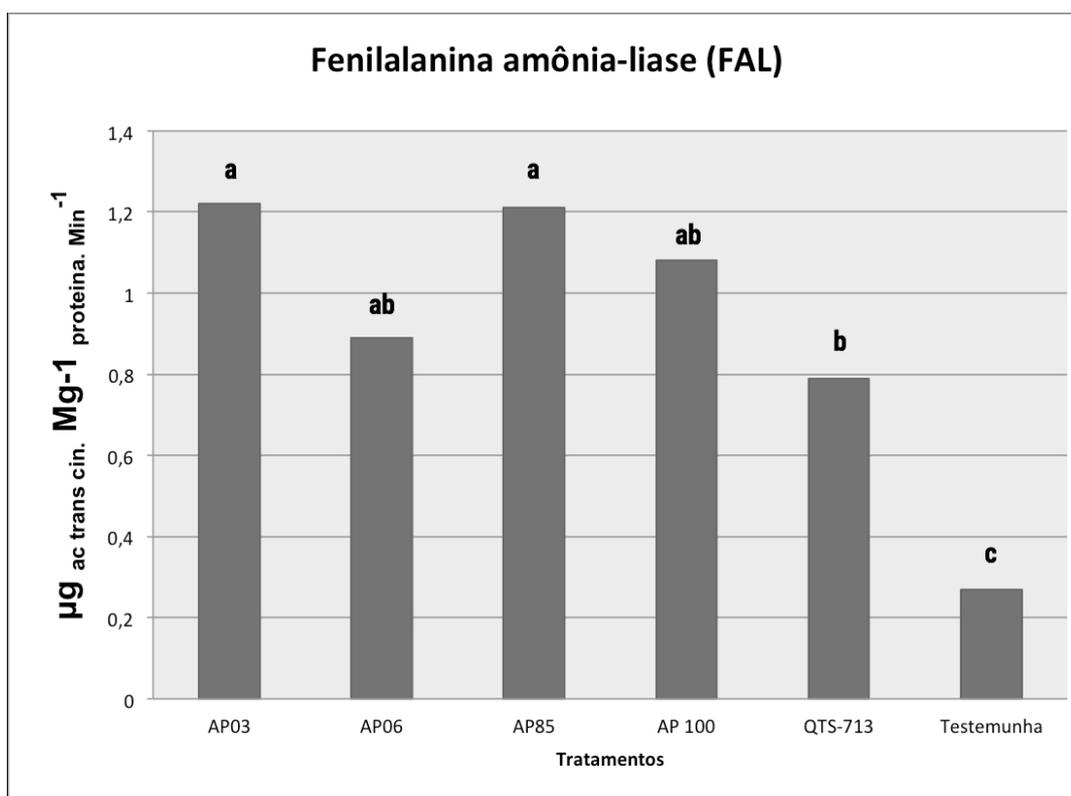


Figura 10 – Efeito dos tratamentos das sementes de tomateiro com isolados de *Bacillus* spp. sobre o teor da enzima fenilalanina amônia-liase em plantas.



4.3 Indução de resistência ao estresse salino

Para a variável altura, não houve interação significativa entre as plantas estressadas com NaCl e as não estressadas, aos 27 e 34 DAS. Entretanto, houve interação entre os fatores aos 41 e 48 DAS. Na terceira semana de avaliação (41 DAS), as plantas cujas sementes foram tratadas com os isolados AP85 e AP100 apresentaram as maiores alturas quando o substrato foi suplementado com NaCl, seguido do isolado AP3. As plantas tratadas com os isolados AP6, QST-713 e a testemunha apresentaram as menores alturas. Nas plantas que não foram submetidas ao estresse, não houve diferença significativa entre os isolados, porém apenas o AP100 diferiu da testemunha. As plantas tratadas com o isolado AP6 e estressadas com NaCl obtiveram menor altura quando comparadas com as que não foram submetidas ao estresse e tratadas com a mesma bactéria. O tratamento com a bactéria AP85 apresentou alturas iguais nas duas condições testadas (Tabela 7). Aos 48 DAS, os isolados AP6, AP85, AP100 e QST713 apresentaram as maiores alturas nas plantas submetidas ao estresse. Para as que não foram estressadas com NaCl, os isolados AP3, AP6 e a testemunha apresentaram as maiores medidas. Todos os tratamentos nas plantas estressadas com NaCl apresentaram alturas menores quando comparadas às não estressadas, exceto o isolado AP85 que não diferiu estatisticamente entre os dois fatores testados.

Para as variáveis diâmetro e teor de clorofila (Tabelas 8 e 9), não houve interação significativa entre os fatores nos quatro períodos de avaliação.

A massa seca e fresca da parte aérea das plantas não apresentaram interação significativa entre os fatores. Mas, houve interação significativa para a massa fresca e seca das raízes, tanto naquelas submetidas ao estresse salino quanto naquelas que não foram suplementadas com o sal (Tabela 10). No grupo de plantas submetidas ao estresse, todos os isolados apresentaram peso fresco maior diferindo estatisticamente da testemunha. Nas plantas não submetidas ao estresse, o maior peso fresco ocorreu naquelas tratadas com as bactérias AP3, AP6, AP100 e QST-713. O isolado AP85 e a testemunha apresentaram o menor peso das plantas.

A análise revelou que o peso seco das raízes para as plantas submetidas ao estresse foram maiores para os isolados AP3, AP6, AP85 e AP100, seguidos do isolado QST-713 e da testemunha, com os menores valores. Para as plantas que não receberam o estresse salino, não houve diferença estatística entre os

tratamentos e testemunha. Na comparação entre os fatores, o isolado AP100 apresentou maior peso nas plantas suplementadas com NaCl do que nas que não receberam o sal. Todavia a testemunha que recebeu o estresse apresentou menor peso do que a que não recebeu.

A redução do crescimento das plantas é um fenômeno comum em condições de alta salinidade. As espécies vegetais encontram dificuldade para se ajustarem osmoticamente e manterem seu desenvolvimento (JAMIL et al., 2007). No presente estudo, foi observado que o tratamento com a bactéria AP85 manteve a altura das plantas estressadas com NaCl no mesmo nível daquelas não estressadas até os 48 DAS. Segundo Mohiddin et al. (2010), os microrganismos sal-tolerantes produzem hormônios vegetais, como auxinas, que estão relacionados ao crescimento mesmo nas condições de estresse. A seleção inicial dos isolados de *Bacillus* revelou que os isolados testados no ensaio são produtores de AIA, o que relaciona a capacidade bioquímica destes microrganismos com a indução de resistência ao estresse abiótico.

É importante salientar que o peso das raízes manteve-se semelhante comparando as plantas submetidas ao estresse com as que não receberam a suplementação com o sal. Isso indica que não houve danos prejudiciais ao sistema radicular como nas plantas testemunhas que foram estressadas. Sem prejuízos ao sistema radicular, as plantas tratadas com o *Bacillus* conseguiram manter uma eficiente absorção de água e conseqüentemente uma boa absorção de nutrientes. Resultados semelhantes foram observados por Mayak et al. (2004) e Jha e Patel (2011). Para a variável clorofila, que indica se houve danos ao sistema fotossintético, os dados não revelaram significância entre os fatores. Desta forma, se faz necessário uma investigação mais aprofundada utilizando métodos que demonstrem um amplo aspecto deste sistema, e que revelem com mais clareza se o tratamento com o *Bacillus* spp. manterá o mecanismo em bom funcionamento.

A atividade enzimática da enzima PO aumentou nos tratamentos com os isolados AP3, AP100 e QST-713 nas plantas submetidas ao estresse salino (Figura 11). As plantas não submetidas ao estresse obtiveram maiores teores da enzima com o tratamento da bactéria AP100 e AP85. Comparando os dois fatores, os isolados AP3 e QST-713 mantiveram os níveis das enzimas mais altos nas plantas suplementadas com o sal do que nas que não receberam o estresse, os isolados

AP6 e AP100 mantiveram os mesmos níveis da enzima nas duas situações testadas.

Para a enzima PPO (Figura 12), os isolados AP3, AP85 e QST-713 apresentaram valores mais altos para o teor da enzima, seguido dos isolados AP6 e AP100 nas plantas submetidas ao estresse em relação à testemunha. Nas plantas não submetidas ao estresse todos os isolados apresentaram maiores atividades da enzima em relação à testemunha. Apenas os isolados AP3, AP85 e QST-713 mantiveram a atividade da enzima mais alta nas plantas estressadas com NaCl do que nas não estressadas. Os isolados AP6 e AP100 mantiveram níveis semelhantes para as enzimas em ambas as situações.

A atividade da FAL (Figura 13) nas plantas submetidas ao estresse salino foi maior para os tratamentos AP6 e AP85, seguido dos isolados AP3, AP100 e QST-713. A testemunha apresentou o menor teor da enzima. Nas plantas não submetidas ao estresse todos os isolados, exceto o AP3 e a testemunha, apresentaram atividade alta para a enzima. Na comparação entre os fatores, todos os isolados obtiveram maior teor da enzima nas plantas estressadas com o sal em relação as que não foram submetidas ao estresse, com exceção ao isolado QST-713 que manteve o índice da enzima no mesmo nível nas duas situações.

Para a L-prolina (Figura 14), os tratamentos não apresentaram interação significativa entre os fatores analisados. No grupo de plantas submetidas ao estresse salino todos os tratamentos apresentaram atividades do osmolito iguais. A testemunha apresentou a menor atividade da variável. Nas plantas não submetidas ao estresse, todos os tratamentos diferiram estatisticamente da testemunha.

O acúmulo de sal nos perfis do solo submetem as espécies vegetais a estresse oxidativo, cadeias reativas de oxigênio são liberadas nas células, aumentando a pressão osmótica e causando toxicidade para a planta. Para combater este problema, as espécies vegetais ativam seu sistema de defesa produzindo enzimas anti-oxidantes (PARIDA, 2004). Por conseguinte, a maior atividade das três enzimas de defesa (PO, PPO e FAL) nas plantas submetidas ao estresse é um evento comum, comparando as que não foram submetidas (Figura 15). Resultados semelhantes foram mostrados por Zhang et al. (2013) e Sorkheh et al. (2012). Apesar da interação entre os fatores não apresentar significância para a variável prolina, foi possível compreender que nas plantas estressadas com sal houve aumento do osmolito, diferindo os tratamentos da testemunha. Os osmolitos

atuam em outra via do sistema de defesa das plantas estressadas com sal: a redistribuição de íons. Ao alcançarem grandes níveis de estresse salino, há o acúmulo excessivo de íons dentro da célula, para normalizar o estresse iônico há redistribuição do excesso de íons para outras partes da planta, principalmente no sistema radicular (PARIDA e DAS, 2004), resultados semelhantes foram observados por Jha e Patel (2011) e Rawat et al. (2012).

Tabela 7 – Efeito dos tratamentos das sementes de tomateiro com isolados de *Bacillus* spp. sobre a altura (cm) aos 27, 34, 41 e 48 dias após a semeadura (DAS) no ensaio de indução de resistência ao estresse salino

Isolado	27 DAS		34 DAS		41 DAS		48 DAS	
	NaCl+ ^{ns}	NaCl- ^{ns}	NaCl+ ^{ns}	NaCl- ^{ns}	NaCl+ ^{**}	NaCl- ^{**}	NaCl+ ^{**}	NaCl- ^{**}
AP03	2,33	2,74	11,53	11,57	20,31 bBC	24,22 aAB	27,89 bB	39,64 aC
AP06	2,61	2,41	11,27	12,54	15,84 bD	24,04 aAB	36,19 bA	47,21 aB
AP85	3,45	3,26	16,09	15,5	24,75 aA	26,00 aAB	38,12 aA	37,98 aC
AP100	2,7	2,63	13,44	13,78	22,92 bAB	26,71 aA	35,69 bA	40,34 aC
QST-713	2,13	2,19	11,21	12,15	18,77 bCD	23,76 aAB	35,19 bA	39,81 aC
Testemunha	2,5	2,4	12,13	13,77	17,31 bCD	23,28 aB	26,82 bB	51,38 aA
CV (%)	17,49		14,7		10,79		8,26	

Médias seguidas com letras maiúsculas iguais nas colunas e minúsculas entre as linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; CV: coeficiente de variação; ns: não significativo; NaCl+: Suplementado a 100mM; NaCl-: Não suplementado com NaCl

Tabela 8 – Efeito dos tratamentos das sementes de tomateiro com isolados de *Bacillus* spp. sobre o diâmetro (mm) aos 27, 34, 41 e 48 dias após a semeadura (DAS) no ensaio de indução de resistência ao estresse salino

Isolado	27 DAS		34 DAS		41 DAS		48 DAS	
	NaCl+ ^{ns}	NaCl - ^{ns}	NaCl + ^{ns}	NaCl - ^{ns}	NaCl + ^{ns}	NaCl - ^{ns}	NaCl + ^{ns}	NaCl - ^{ns}
AP3	2,35	2,36	4,1	4,34	5,85	6,59	6,65	7,65
AP6	2,27	2,12	4,45	4,47	5,86	6,45	6,66	7,23
AP85	2,84	3,08	4,87	5	6,18	6,53	6,83	7,44
AP100	2,7	2,49	4,48	4,73	6,22	6,75	6,98	8,15
QST-713	1,99	2,11	4,11	4,17	5,79	6,31	6,62	7,31
Testemunha	2,24	2,31	4,36	4,68	5,87	6,1	6,74	7,45
CV (%)	14,18		10,68		8,87		6,9	

Médias seguidas com letras minúsculas iguais nas colunas e maiúsculas entre as linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; CV: coeficiente de variação; ns: não significativo; NaCl+ : Suplementado a 100mM; NaCl- : Não suplementado com NaCl

Tabela 9 – Efeito dos tratamentos das sementes de tomateiro com isolados de *Bacillus* spp. sobre a clorofila aos 27, 34, 41 e 48 dias após a semeadura (DAS) no ensaio de indução de resistência ao estresse salino

Isolado	Clorofila (Unidades SPAD)							
	27 DAS		34 DAS		41 DAS		48 DAS	
	NaCl + ^{ns}	NaCl - ^{ns}	NaCl + ^{ns}	NaCl - ^{ns}	NaCl + ^{ns}	NaCl - ^{ns}	NaCl + ^{ns}	NaCl - ^{ns}
AP03	27,45	28,79	29,78	31,44	43,35	41,65	45,68	44,28
AP06	29,25	29,31	31,86	31,72	41,07	41,33	43,68	44,07
AP85	28,07	27,61	31,52	30,87	41,79	39,8	45,24	42,21
AP100	29,57	27,67	32,27	30,3	41,85	39,41	44,45	41,6
QST-713	28,64	29,23	30,77	31,22	38,58	38,28	40,71	41,39
Testemunha	31,52	30,3	34,02	32,7	41,52	38,13	44,32	40,68
CV(%)	10,27		9,44		8,63		8,08	

Médias seguidas com letras minúsculas iguais nas colunas e maiúsculas entre as linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; CV: coeficiente de variação; ns: não significativo; NaCl+ : Suplementado a 100mM; NaCl- : Não suplementado com NaCl

Tabela 10 – Efeito dos tratamentos das sementes de tomateiro com isolados de *Bacillus* spp. sobre o peso das plantas aos 27, 34, 41 e 48 dias após a semeadura (DAS) no ensaio de indução de resistência ao estresse salino

Isolado	massa (g)							
	Peso fresco PA		Peso seco PA		Peso fresco raiz		Peso seco raiz	
	NaCl + ^{ns}	NaCl - ^{ns}	NaCl + ^{ns}	NaCl - ^{ns}	NaCl + ^{**}	NaCl - ^{**}	NaCl + ^{**}	NaCl - ^{**}
AP3	74,27	74,67	9,46	12,29	14,64 aAB	16,06 aA	2,12 aAB	2,35 aA
AP6	75,85	75,79	11,7	13,81	14,45 aAB	15,043 aA	2,16 aAB	2,30 aA
AP85	53,33	40,15	12,67	14,53	12,69 aB	8,91b bC	2,34 aA	1,86 aAB
AP100	75,2	74,56	11,25	12,77	15,01 aA	15,95 aA	2,09 aAB	1,38 bB
QST-713	75,37	75,57	10,53	12,93	13,97 aAB	14,82 aA	1,69 aB	1,86 aAB
Testemunha	52,38	39,29	8,92	11,5	8,05 bC	11,74 aB	1,52 bC	1,78 aAB
CV(%)	15,94		16,23		19,98		12,79	

Médias seguidas com letras minúsculas iguais nas colunas e maiúsculas entre as linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; CV: coeficiente de variação; ns: não significativo; NaCl+ : Suplementado a 100mM; NaCl- : Não suplementado com NaCl

Figura 11 - Efeito dos tratamentos das sementes de tomateiro com isolados de *Bacillus* spp. sobre o teor da enzima peroxidase nas plantas; NaCl⁺ : Plantas submetidas a estresse salino (100mM de NaCl); NaCl⁻: Plantas não submetidas ao estresse

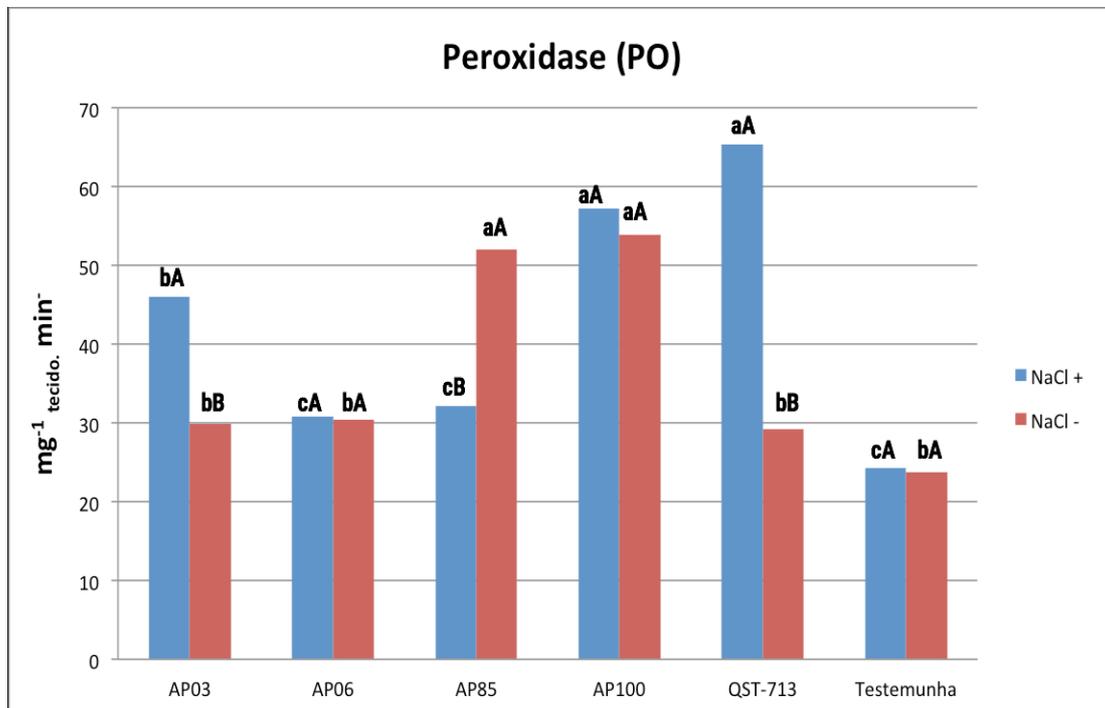


Figura 12 - Efeito dos tratamentos das sementes de tomateiro com isolados de *Bacillus* spp. sobre o teor da enzima polifenoloxidase nas plantas; NaCl⁺ : Plantas submetidas a estresse salino (100mM de NaCl); NaCl⁻: Plantas não submetidas ao estresse

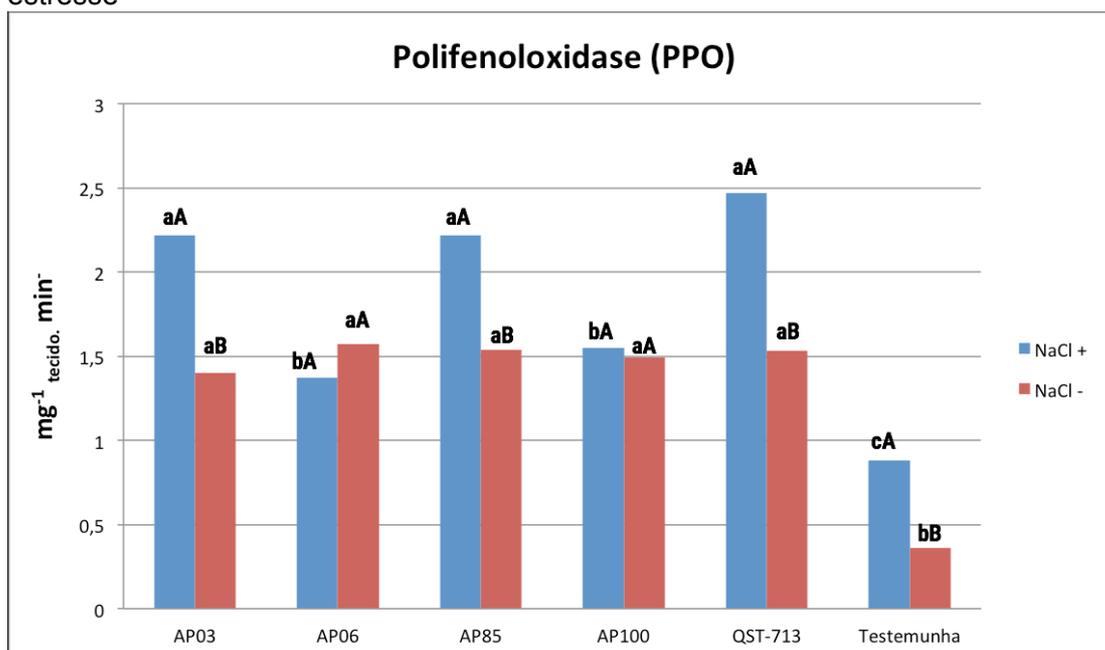


Figura 13 - Efeito dos tratamentos das sementes de tomateiro com isolados de *Bacillus* spp. sobre o teor da enzima fenilalanina amônia-liase nas plantas; NaCl+ : Plantas submetidas a estresse salino (100mM de NaCl); NaCl-: Plantas não submetidas ao estresse

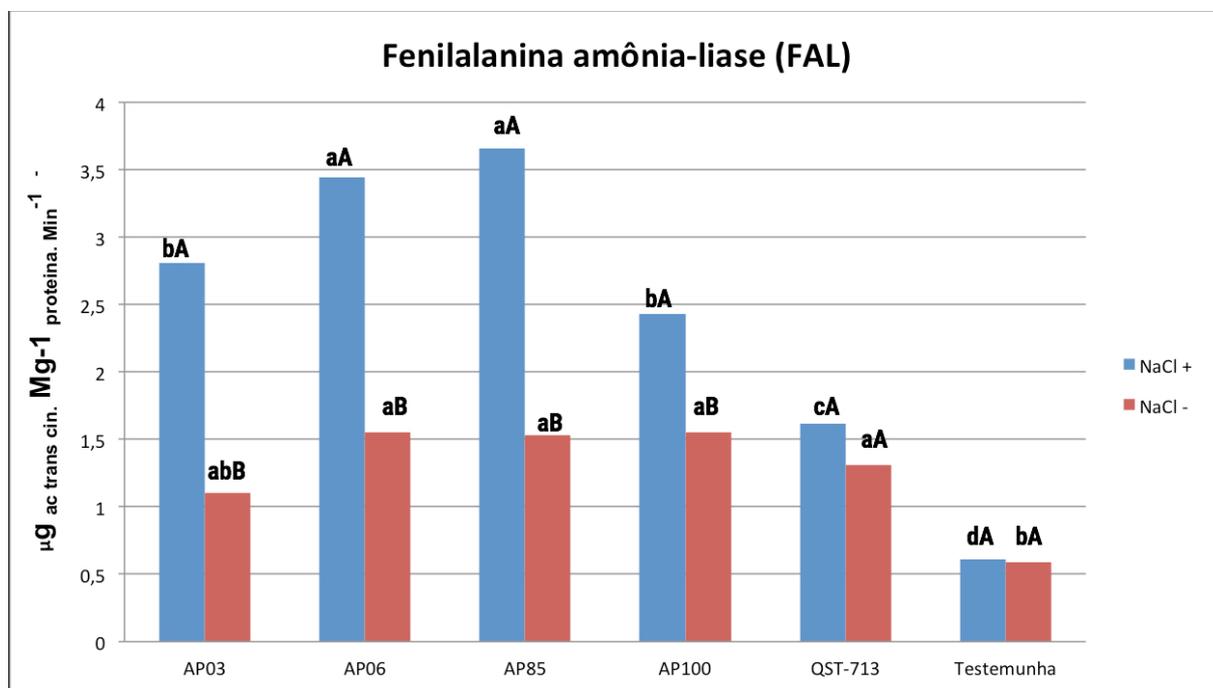


Figura 14 - Efeito dos tratamentos das sementes de tomateiro com isolados de *Bacillus* spp. sobre o teor de L-prolina nas plantas; NaCl+ : Plantas submetidas a estresse salino (100mM de NaCl); NaCl-: Plantas não submetidas ao estresse

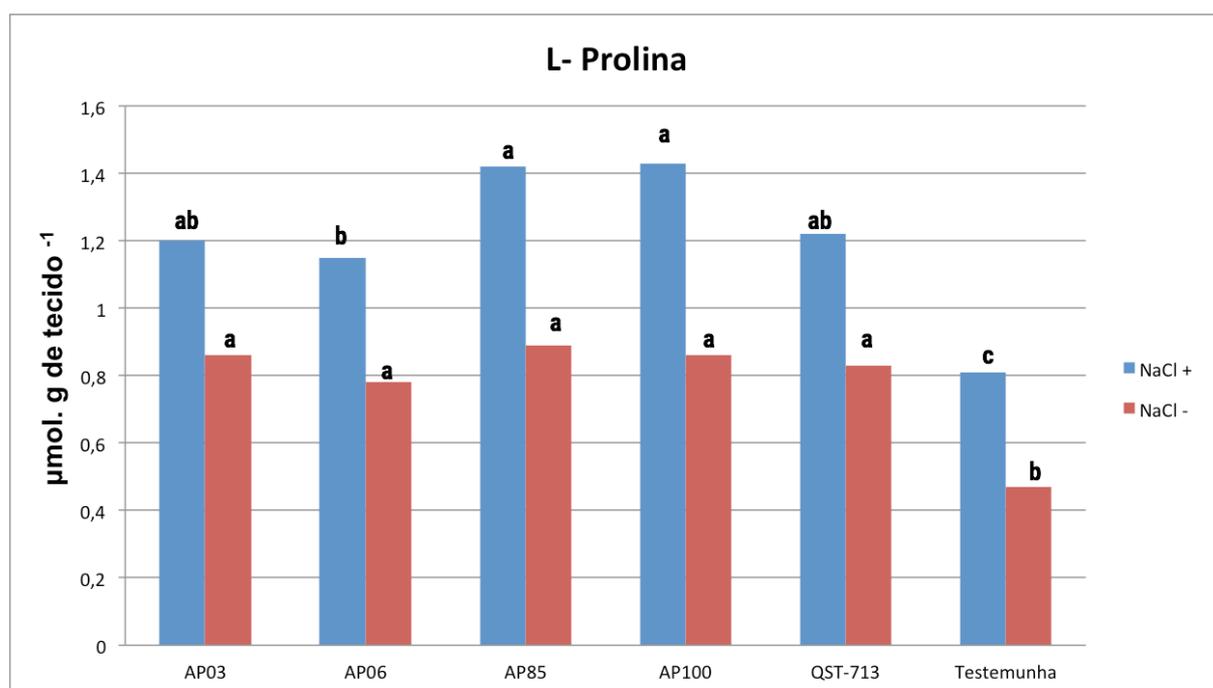


Figura 15 – Efeito dos tratamentos das sementes de tomateiro com isolados de *Bacillus* spp. sobre plantas de tomateiro.



Plantas submetidas a estresse salino (100mM NaCl)



Plantas não submetidas ao estresse

4.4 Eficiência de *Bacillus* no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Para a variável altura, aos 27 DAS houve diferença estatística entre o tratamento QST-713 e os demais tratamentos. Aos 34 DAS, a testemunha que foi inoculada com o *F. oxysporum* obteve uma menor altura junto com o tratamento QST-713. Os demais tratamentos apresentaram altura maior e não diferiram estatisticamente entre si. Aos 41 DAS, os isolados AP3, AP6, AP85, AP100 e a testemunha sem *F. oxysporum* apresentaram maior altura, seguido do isolado QST-713. A testemunha que desenvolvida em solo infestado com *F. oxysporum* apresentou a menor altura (Tabela 11).

As análises para a variável diâmetro revelaram que aos 27 DAS não houve diferença estatística entre os tratamentos e testemunhas. Aos 34 DAS observou-se maior diâmetro para os tratamentos AP3, e AP85, e a testemunha sem *F. oxysporum*. O tratamento com o isolado QST-713 e a testemunha com o *F. oxysporum* apresentaram os menores diâmetros. Aos 41 DAS houve diferença

estatística somente entre os tratamentos e a testemunha que recebeu o *F. oxysporum* (Tabela 12).

Para a variável clorofila aos 27 DAS observou-se que houve um maior teor na testemunha que não recebeu o *F. oxysporum*, seguido dos demais tratamentos. O menor valor foi observado na testemunha que foi inoculada com o fungo. Na segunda análise aos, 34 DAS, houve diferença significativa entre os tratamentos AP3, AP85, AP100, QST-713 e a testemunha sem o *F. oxysporum* em relação a testemunha que foi inoculada com o fungo e o tratamento AP6. O teor de clorofila aos 41 DAS foi semelhante a análise aos 34 DAS, não havendo mudanças nesse intervalo de tempo (Tabela 13).

Em relação aos pesos das plantas (Tabela 14), para o peso fresco da parte aérea, os tratamentos AP3, AP85, AP100 e a testemunha sem *F. oxysporum*, apresentaram os maiores pesos, seguidos dos tratamentos AP6 e QST-713. A testemunha inoculada com o *F. oxysporum* apresentou o menor peso. Após secagem das plantas, os isolados AP3, AP85, AP100, QST713 e a testemunha sem o *F. oxysporum*, apresentaram os maiores pesos secos, diferindo estatisticamente do tratamento AP6 e da testemunha inoculada com o fungo. Para o peso fresco da raiz os isolados AP3, AP85, AP100 e a testemunha sem o *F. oxysporum*, apresentaram os maiores pesos, seguido do tratamento com o QST-713. O tratamento com o isolado AP6 e a testemunha inoculada com o *F. oxysporum* apresentaram os menores pesos frescos. Para o peso seco da raiz os tratamentos AP3, AP85, AP100 e a testemunha sem o *F. oxysporum* continuaram a apresentar os maiores resultados, seguidos dos tratamentos AP6 e QST-713, a testemunha inoculada com o fungo apresentou o menor peso seco.

Os parâmetros de crescimento das plantas aumentaram gradualmente para aquelas tratadas com os isolados de *Bacillus*, em relação à testemunha, que foi inoculada com o fungo. Inicialmente, esses dados indicam o potencial do agente de controle biológico em manter o crescimento da planta mesmo em condições adversas, revelando que o gênero *Bacillus* pode se adaptar a diferentes situações de estresse. Neste caso em particular, em que o patógeno é veiculado pelo solo, demonstra-se mais uma potencialidade deste gênero de bactérias, já que tais patógenos estão adaptados a permanecerem por longos períodos de tempo causando doenças de difícil controle. As propriedades bioquímicas destas bactérias, aliado ao fato de serem eficientes colonizadoras do sistema radicular, somam mais

um mecanismo eficiente para gerar a tolerância da planta ao estresse, resultados semelhantes foram observados por Agarwal et al. (2017) e por Gupta e Vakhlu (2015).

É importante destacar que a metodologia de análise dos teores de clorofilas correspondem a vários pigmentos verdes intimamente interligados nos cloroplastos, desta forma permite-se que as plantas absorvam energia através da fotossíntese. Um dos sintomas específicos da doença vascular causada por *F. oxysporum* é o amarelecimento da área foliar prejudicando o processo de fotossíntese e o desenvolvimento das plantas (ZALILA-KOLSI et al., 2016). Os resultados obtidos na análise da variável clorofila, nos três períodos, demonstram que as plantas tratadas com *Bacillus* mantiveram o teor destes pigmentos maior do que as plantas não tratadas com as bactérias e infestadas com o fitopatógeno. Após a segunda semana esse teor se manteve próximo da testemunha não inoculada com *F. oxysporum* demonstrando que os isolados utilizados no tratamento podem ativar o sistema de defesa da planta e impedir que os níveis de pigmentos fotossintéticos baixem (PATEL; SARAF, 2017).

Tabela 11 – Efeito do tratamento de mudas de tomateiro com isolados de *Bacillus* spp. sobre a altura das plantas desenvolvidas em substrato infestado com *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3

Isolado	Altura (cm)		
	27 DAS	34 DAS	41 DAS
AP3	10,27* a	21,48 a	49,25 a
AP6	10,48 a	21,48 a	47,45 a
AP85	10,78 a	20,97 a	48,91 a
AP100	9,87 a	20,74 a	52,47 a
QTS-713	4,88 b	12,32 b	36,10 b
Test. 1	10,48 a	19,57 a	45,37ab
Test. 2	8,81 a	17,073 b	21,84 c
CV (%)	16,24	19,75	17,72

*Na coluna, médias seguidas com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; Test. 1: Testemunha não inoculada com *F. oxysporum*. Test. 2: Testemunha inoculada com *F. oxysporum*

Tabela 12 - Efeito do tratamento de mudas de tomateiro com isolados de *Bacillus* spp. sobre o diâmetro das plantas desenvolvidas em substrato infestado com *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3

Isolado	Diâmetro (mm)		
	27 DAS	34 DAS	41 DAS
AP3	1,62* a	3,88 ab	5,72 a
AP6	1,33 a	3,69 abc	5,27 a
AP85	1,55 a	4,18 a	5,36 a
AP100	1,48 a	3,52 abc	5,25 a
QTS-713	1,12 a	2,75 bc	4,99 a
Test. 1	1,5 a	3,41 abc	4,74 a
Test. 2	1,9 a	2,54 c	2,95b
CV(%)	13,46	15,53	11,44

*Na coluna, médias seguidas com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; Test. 1: Testemunha não inoculada com *F. oxysporum*. Test. 2: Testemunha inoculada com *F. oxysporum*.

Tabela 13 – Efeito do tratamento de mudas de tomateiro com isolados de *Bacillus* spp. sobre o teor de clorofila das plantas desenvolvidas em substrato infestado com *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3

Isolado	Clorofila (Unidade SPAD)		
	27 DAS	34 DAS	41 DAS
AP3	31,45* c	31,30 a	31,30 a
AP6	33,62 bc	22,07 b	22,07 b
AP85	34,50 b	28,64 a	28,64 a
AP100	33,89 bc	29,25 a	29,25 a
QTS-713	34,94 b	31,57 a	31,57 a
Test. 1	37,47 a	30,96 a	30,96 a
Test. 2	28,38 d	21,06 b	21,06 b
CV(%)	7,99	10,83	11,44

*Na coluna, médias seguidas com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; Test. 1: Testemunha não inoculada com *F. oxysporum*. Test. 2: Testemunha inoculada com *F. oxysporum*

Tabela 14 – Efeito do tratamento de mudas de tomateiro com isolados de *Bacillus* spp. sobre o peso das plantas desenvolvidas em substrato infestado com *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3

Isolado	Massa fresca parte aérea (g)	Massa seca parte aérea (g)	Massa fresca raiz (g)	Massa seca raiz (g)
AP3	62,38* a	3,12 a	10,18 a	2,32 a
AP6	36,78 b	1,45 b	3,78 c	1,53 b
AP85	63,07 a	3,16 a	9,68 a	2,36 a
AP100	63,08 a	3,30 a	10,33 a	2,4 a
QTS-713	39,46 b	3,34 a	6,90 b	1,34 bc
Test. 1	55,02 a	2,8 a	11,17 a	2,37 a
Test. 2	23,12 c	1,92 b	3,40 c	1,06 c
CV(%)	19,17	19,79	19,89	11,61

*Na coluna, médias seguidas com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; PA: parte aérea; Test. 1: Testemunha não inoculada com *F. oxysporum*. Test. 2: Testemunha inoculada com *F. oxysporum*

Para os sintomas externos foi calculada a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), levando em consideração as três datas de avaliação (27, 34 e 41 DAS). As plantas tratadas com o isolado AP3 apresentaram os menores índices de severidade, os tratamentos realizados com os isolados AP6, AP85, AP100 e QST713 não demonstraram redução na severidade, com resultados semelhantes a testemunha inoculada com o *F. oxysporum* (Figura 16).

Em relação aos sintomas internos observou-se que os isolados AP6, AP100 e a testemunha inoculada com o *F. oxysporum* apresentaram o maior nível de severidade, seguidos dos tratamentos AP85 e QST-713. As plantas tratadas com o isolado AP3 e a testemunha sem a inoculação do *F. oxysporum* apresentaram a menor severidade (Figura 17).

De acordo com Markovich e Kononova (2003), a colonização da raiz por um antagonista é essencial para a supressão de uma doença causada por um patógeno do solo. O gênero *Bacillus* é conhecido por ser um bom colonizador da raiz (PINHO et al., 2009), tornando-se um importante competidor contra o *F. oxysporum*. No presente estudo, as plantas tratadas com o isolado AP3 apresentaram, desde a primeira semana de avaliação, o menor nível de severidade da doença para os sintomas externos, isso indica que o isolado foi capaz de colonizar a planta e ativar os mecanismos de resistência induzida (Figura 18). Na análise dos sintomas

internos o mesmo isolado demonstrou a eficiência de impedir a colonização do sistema vascular pelo fungo fitopatogênico. O isolado QST-713 apresentou um resultado intermediário se comparado a testemunha não inoculada com *F. oxysporum*. Desta forma, os dois isolados demonstraram habilidade de biocontrole, todavia o isolado AP3 apresentou melhores propriedades na indução de resistência das plantas de tomateiro, resultados semelhantes foram obtidos por Cordero-Ramírez et al. (2013) e Shahzad et al. (2017).

Figura 16 – Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em relação ao efeito do tratamento de mudas de tomateiro com isolados de *Bacillus* spp. sobre os sintomas externos nas plantas desenvolvidas em substrato infestado com *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3. Test: testemunha não inoculada com *Fusarium oxysporum*. FOL: testemunha inoculada com *F. oxysporum*.

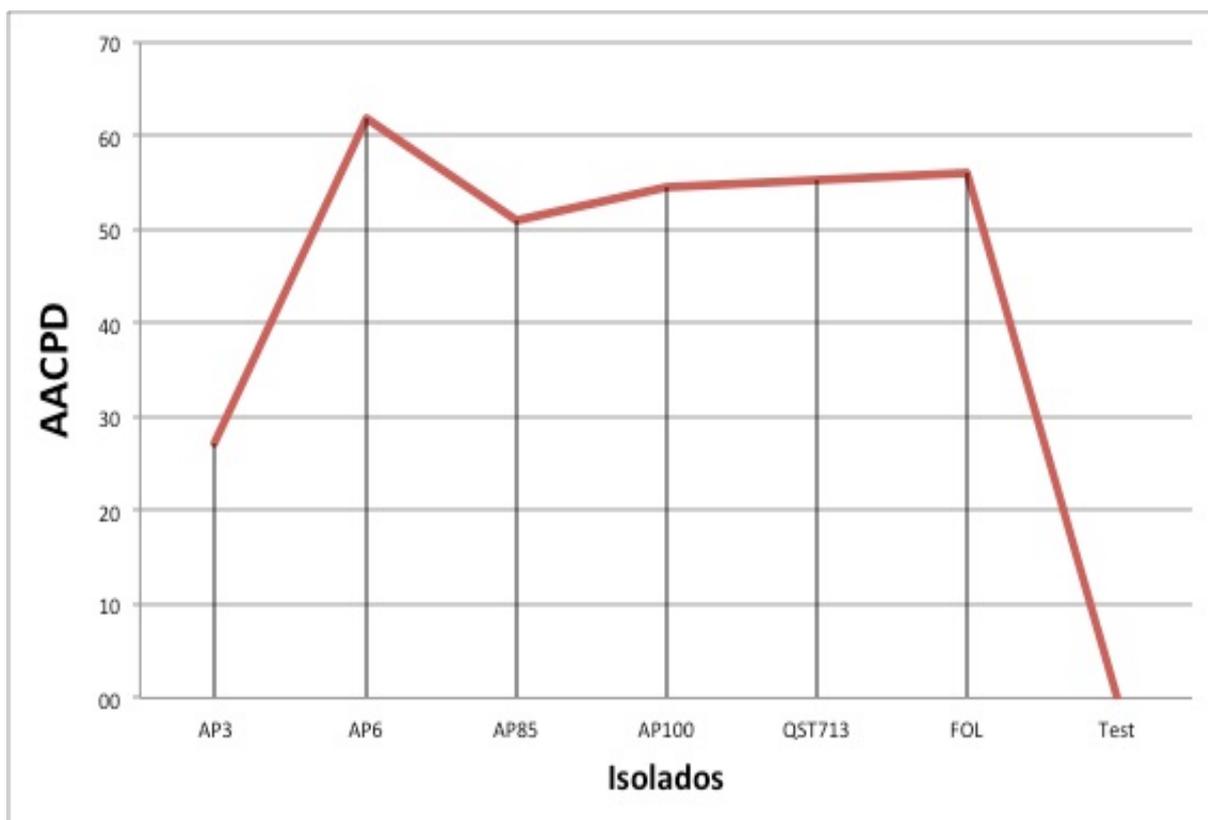


Figura 17 - Efeito do tratamento de mudas de tomateiro com isolados de *Bacillus* spp. sobre os sintomas internos nas plantas desenvolvidas em substrato infestado com *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3. Test: testemunha não inoculada com *Fusarium oxysporum*. FOL: testemunha inoculada com *F. oxysporum*.

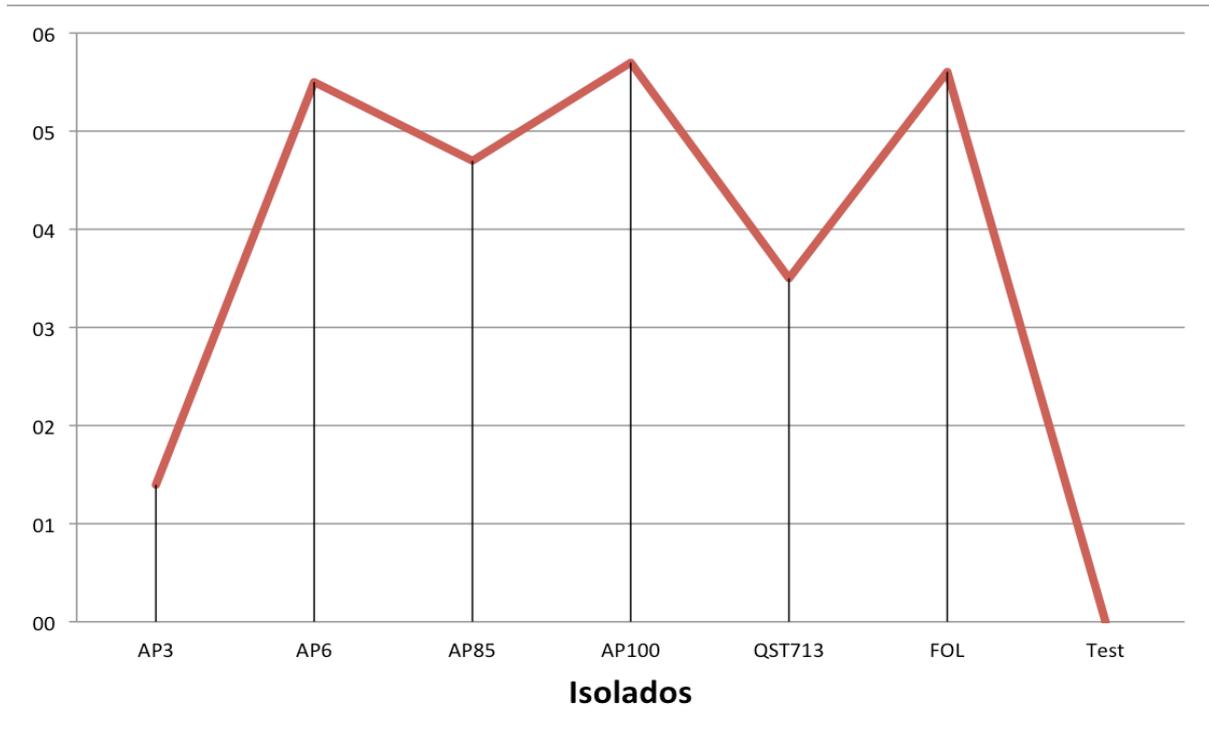
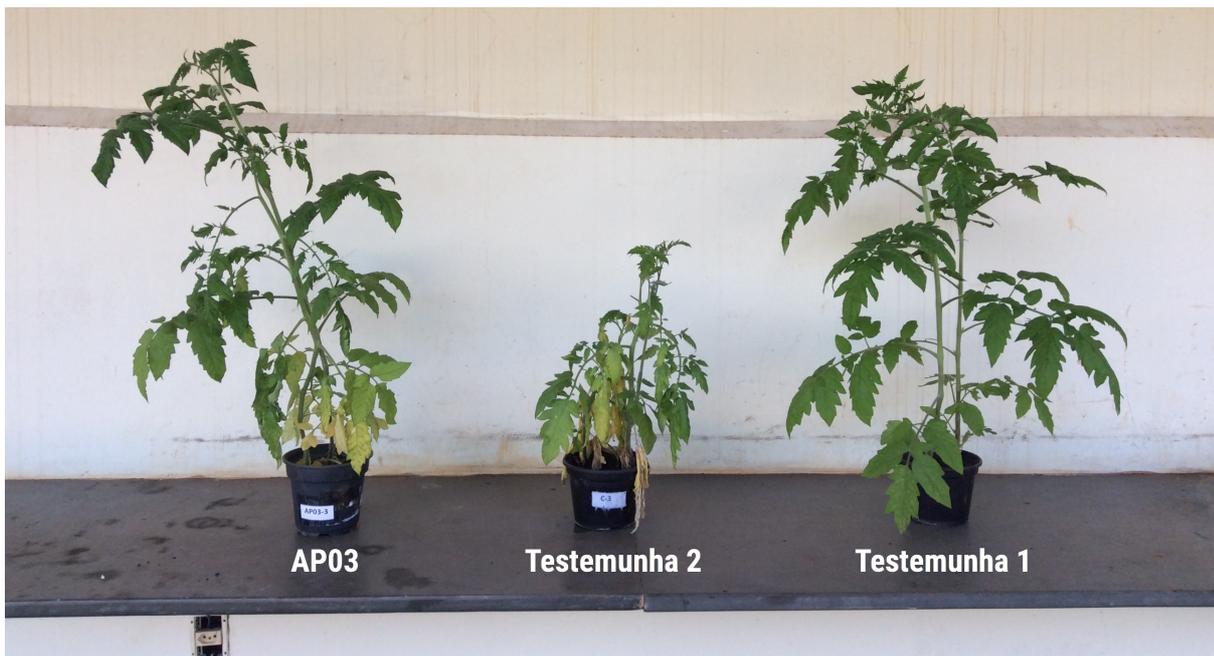


Figura 18 – Efeito do tratamento das mudas de tomateiro com isolado de *Bacillus* spp. (AP3) sobre plantas de tomateiro.

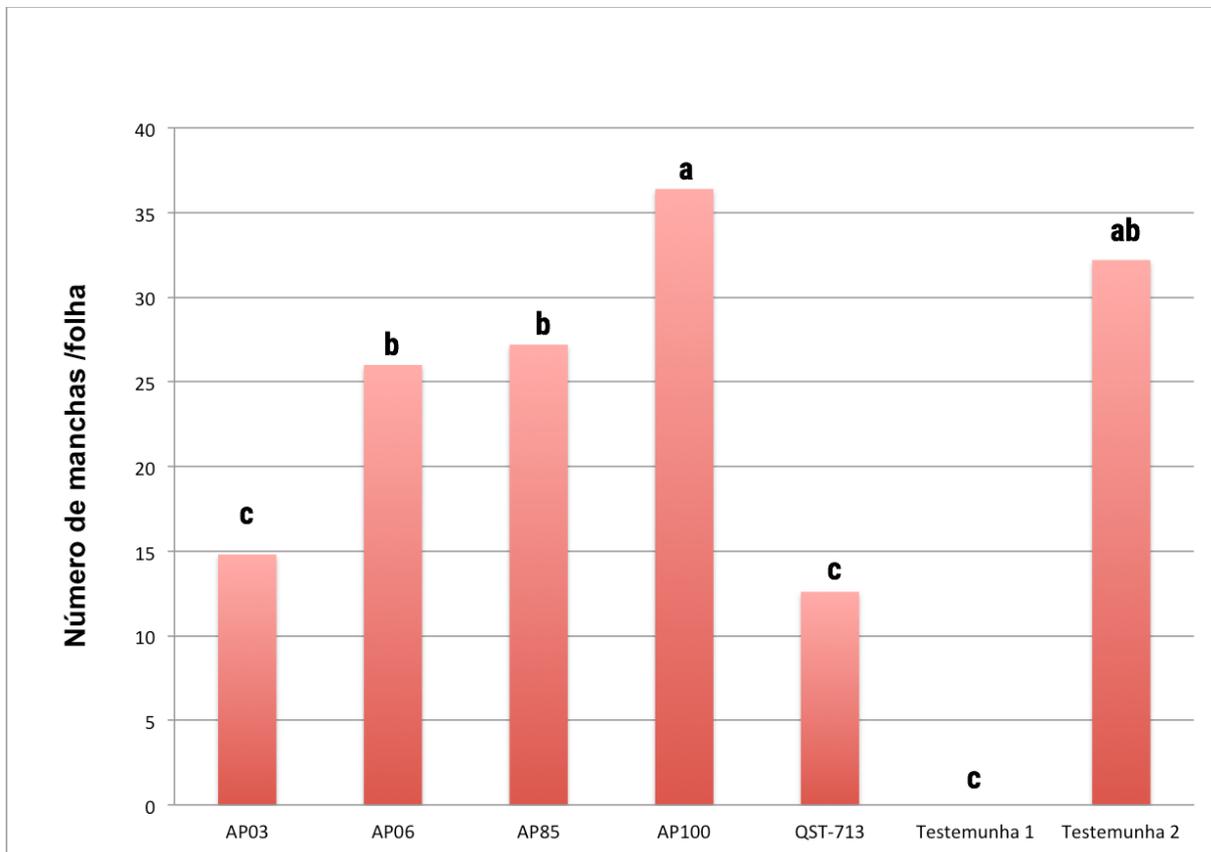


4.5 Eficiência de *Bacillus* no controle de *Oidium*

As plantas tratadas com os isolados QST-713, AP3 e a testemunha não inoculada com Oídio apresentaram o menor número de lesões por área foliar, seguido dos isolados AP6 e AP85 que obtiveram valores intermediários quanto a variável. O isolado AP100 e a testemunha que foi inoculada com o fungo apresentaram o maior número de lesões por folha (Figura 19).

Segundo a classificação de doenças de plantas propostas por McNew (1960), o *Oidium* se enquadra no grupo V, cujo principal característica é o dano no aparelho fotossintético. Desta forma, pode-se afirmar que os isolados AP3 e QST-713 conseguiram promover indução de resistência nas plantas de tomateiro, ao diminuírem o número de lesões na área foliar se comparados com as plantas testemunhas que não receberam o tratamento com *Bacillus*, mas foram inoculadas com oídio. A aplicação de *Bacillus* foi realizada no solo o que indica que este gênero de bactérias é capaz de induzir resistência a patógenos que causam doença na parte aérea, distantes de onde foram inoculados, e não somente na área específica onde o patógeno inicia a infecção, como foi o caso do *F. oxysporum* no ensaio anterior. Resultados semelhantes foram observados por Yamamoto et al. (2014) também em tomateiro utilizando *B. amyloliquefaciens* (S13-3). Os resultados também indicam que os *Bacillus* podem estar induzindo resistência sistêmica através da sinalização de algum antifúngico ou ativação de algum gene de defesa específico, que merecem melhor investigação, como mostrado por Zhang et al., (2013) em Cucurbitáceas, onde ocorreu indução de resistência através da via de sinalização de ácido salicílico e algumas enzimas de defesa.

Figura 19 - Efeito do tratamento de mudas de tomateiro com isolados de *Bacillus* spp. sobre as lesões foliares causadas por *Oidium*. Test. 1: Testemunha não inoculada com *Oidium*. Test. 2: Testemunha inoculada com *Oidium*.



5 CONCLUSÕES

Os resultados encontrados neste estudo permitiu concluir que:

- As características bioquímicas das bactérias do gênero *Bacillus* estão diretamente relacionadas com a indução de resistência nas plantas, demonstrando que esse tipo de seleção é eficaz;
- O gênero *Bacillus* apresentou potencial para a promoção de crescimento na cultura do tomateiro;
- Em situações de alta concentração de NaCl, as plantas tratadas com isolados de *Bacillus* ativaram seu sistema de defesa e expressando mais de um mecanismo de tolerância ao sal;
- O isolado AP3 apresentou eficiência na indução de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3.
- Os isolados AP3 e QST-713 apresentaram eficiência no controle do *Oidium*, demonstrando que os mecanismos de defesa ativados pelo *Bacillus* conseguem ser eficientes sistemicamente nas plantas.

REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, R. A. B.; TLILI, S.M.; NEFZI, A.; JABNOUN-KHIAREDDINE, H. Biocontrol of *Fusarium* wilt and growth promotion of tomato plants using endophytic bacteria isolated from *Nicotiana glauca* organs. **Biological Control**. Denver, v. 97, p.80-88. 2016.
- AGARWAL, M.; DHEEMAN, S.; DUBEY, R.C.; KUMAR, P. MAHESHWARI, K., D. BAJPAI, K.V. Differential antagonistic responses of *Bacillus pumilus* MSUA3 against *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* causing fungal diseases in *Fagopyrum esculentum* Moench. **Microbiology research**. Montgomery, v.205, p. 40-47. 2017.
- AGASTIAN, P.; KINGSLEY, S.J.; VIVEKANANDAN, M. Effects of salinity on photosynthesis and biochemical characteristics in mulberry genotypes. **Photosynthetica**. Talahasee, v.38, p287-290. 2000.
- ALIAN, A.; ALTMAN, A.; HEUER, B. Genotypic difference in salinity and water stress tolerance of fresh market tomato cultivars, **Plant Science**. London, v.152, p.59-65, 2000.
- ALSCHER, R. G.; DONAHUE, J. L.; CRAMER, C. L. Reactive oxygen species and antioxidants: relationship in green cells. **Physiologia Plantarum**. Copenhagen. v.100, p.224-233, 1997.
- ALVINDIA, D.G.; KOBAYASHI, T.; YAGUCHI, Y.; NATSUAKI, K.T. Symptoms and the associated fungi of postharvest diseases on non-chemical bananas imported from the Philippines. **Japanese Journal of Tropical Agriculture**. Tokyo, v.44, p.87-93. 2009.
- AMALRAJ, E. L. D.; MOHANTY, D.; KUMAR, G. P.; DESAI, S. AHMED, S. M. H.; PRADHAN, R.; KAHN, S. S. Potential Microbial Consortium for plant growth promotion of sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Proceedings of the National Academy of Sciences**. San Diego. v., p.635-642. 2015.
- ANDRADE, D. E. G. T. de; SOUZA, L. T.; ASSIS, T. C. Murcha-de-fusário: importante doença do tomateiro no Estado de Pernambuco. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**. Recife, v. 6, p. 243-263, 2009.
- BABU, A. N.; JOGAIHAH, S.; ITO, S.; NAGARAJ, A.K.; TRAN., L.P. Improvement of growth, fruit weight and early blight disease protection of tomato plants by rhizosphere bacteria is correlated with their beneficial traits and induced biosynthesis of antioxidant peroxidase and polyphenol oxidase. **Plant science**. London, v. 231, p.62-73. 2015.
- BALARAJU, K.; PARK, K.; JAHAGIDAR, S.; KAVIYARASAN, V. Production of cellulose and lacase enzymes by *Oudemansiella radicata* using agro wasters under

solid-test and submerged conditions. **Research in Biotechnology**. New York, v.1, p.21-38. 2010.

BATES L.S.; WALDREN R.P.; TEARE, I.D. Rapid determination of free proline for water stress studies. **Plant Soil**. Detroit, v.39, p.205-207. 1973.

BETTIOL, W. Seleção de microrganismos antagônicos a *Pyricularia oryzae* cav. para controle da brusone do arroz (*Oryza sativa* L.). **Tese (Doutorado em Fitopatologia)**. Escola Superior de Agricultura, Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo, Piracicaba. 1988.

BETTIOL, W.; GARIBALDI, A.; MIGHELI, Q. *Bacillus subtilis* for the control of powdery mildew on cucumber and zucchini squash. **Bragantia**, Campinas, v.56, n.2, p.281-287. 1997.

BHATTACHARYYA, P.N.; JHA, D.K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal Microbiology Biotechnology**, Dublin, v.28, p.1327–1350. 2012.

BOYLAN, S.A.; REDFIELD, A.R.; BRODY, M.S.; PRICE, C.W. Stress-induced activation of the sigma B transcription factor of *Bacillus subtilis*. **Journal of bacteriology**. Dublin, v.175, p.7931–7. 1993.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal of Biochemic**. London. v. 72, p. 248-254. 1976.

BRAY, E. A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses. In: BUCHANAN, B. B., GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (Ed.). **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Rockville, v.5, p.1158-1203. 2000.

BRIC, J.M.; BOSTOCK, R.M.; SILVERSTONE, S.E. Rapid *in situ* assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocelulose membrane. **Applied and environmental microbiology**. Washington, v.57, p. 535-538, 1991.

BUENO, C.J.; FISCHER, I.H.; ROSA, D.D.; FURTADO, E.L. Produção de enzimas extracelulares por *Fusarium solani* maracujazeiro amarelo. **Tropical Plant Pathology**. São Paulo, v.34, p.343-346. 2009.

CAKIR, O.; SULE, A. Defensive and secondary metabolism in *Astragalus chrysochlorus* cell cultures, in response to yeast extract stressor. **Jornal Environmental Biology**. Amsterdam, v.30, p.51-55, 2009.

CAMPOS SILVA, J.R.; SOUZA, R.M.; ZACARONE, A.B.; SILVA, L.H.C.P.; CASTRO, A.M.S. Bactérias endofíticas no controle e inibição *in vitro* de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, agente da pinta bacteriana do tomateiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Rio de Janeiro, v.32, p.1062-1072, 2008.

CANO, R.J.; BORUCKI, M.K. Revival and identification of bacterial spores in 25 to 40 million year old Dominican Amber. **Science**. Nova York v.268, p. 1060-1064, 1995.

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

CLEMENTE, J.M.; CARDOSO, C.R.; VIEIRA, B. S.; FLOR, I.M.; COSTA, R.L. Use of *Bacillus* spp. as growth promoter in carrot crop. **African Journal of Agricultural Research**. Johannesburg, v.11, p. 3355-3359. 2016.

CHEN, Y.; GAO, X.; CHEN, Y.; QIN, C. H.; HAN, Q. Inhibitory efficacy of endophytic *Bacillus subtilis* EDR4 against *Sclerotinia sclerotiorum* on rapeseed. **Biological Control**. London.v.78, p.67 a 76. 2014.

COMPANT, S.; CLEMENT, C.; SESSISTSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**. San Diego, v. 42, p. 669-678. 2010.

CORDERO-RAMIREZ, J.D.; RIVERA, R.; FIGUEROA-LOPEZ, A.M.; LOPEZ-MANCERA, M.E.; MARTINEZ-ALVAREZ, J.C.; SANCHEZAPODACA, M. A.; MALDONADO-MENDOZA, I. E. Native soil bacteria isolates in Mexico exhibit a promising antagonistic effect against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. **JOURNAL OF BASIC MICROBIOLOGY**. Lille, v. 53, p.838-847 2013.

DASGAN H.Y.; AKTAS, H.; ABAK, K, CAKMAK, I. Determination of screening techniques to salinity tolerance in tomatoes and investigation of genotype responses. **Plant Science**, London, v.163, p.695-703. 2002.

DAVIS, J. M.; DOUGLAS C. S.; PAUL V. N., Laura, L.; WADE J. S.; Boron Improves Growth, Yield, Quality, and Nutrient Content of Tomato. **Journal of American Society Horticultural Science**. Ciudad del Mexico, v.128, p. 441-446. 2003.

DAY, J.M.; DOBEREINER, J. Physiological aspects of N₂ fixation by a *Spirillum* from *Digitaria* roots. **Soil and Biochemistry**. Oxford, v.8, p.45-50. 1976.

DEMIRAL, M. A. Comparative response of two olive (*Olea europaea* L.) cultivars to salinity. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**. Istanbul, v.29, n.4, p.267-274, 2005.

DOBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J.I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. **EMBRAPA-SPI**. Brasília. P. 60. 1995.

DORIGHELLO, D.V.; BETTIOL, W.; MAIA, N.B.; CAMPOS LEITE, R.M.V.B. Controlling Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) with *Bacillus* spp. and coffee oil. **Crop Protection**. Davis, v. 67, p.59-65. 2015.

DUANGMAL, K.; APENTEN, R.K.O. A comparative study for polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). **Food Chemistry**. Oxford, v. 64, n.3, p. 351-359, 1999.

DIAS, R. P. Produtos fitossanitários com uso aprovado para a agricultura orgânica no Brasil. **Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento**. Brasília. 2016.

FAO. **Faostat**. Disponível em: <faostat.fao.org>. Acesso em: 1 de Fevereiro. 2018.

FERRAZ, H. G. M.; RESENDE, R.S.; SILVEIRA, P. R.; ANDRADE, C.C.L.; MILAGRES, E.A.; OLIVEIRA, J.R.; RODRIGUESF. A. Rhizobacteria induces resistance against Fusarium wilt of tomato by increasing the activity of defense enzymes. **Bragantia**, Campinas, v. 73, n. 3, p.274-283, 2014.

FERREIRA, S.M.R.; FREITAS, R.J.S.; LAZZARI, E.N. Padrão de identidade e qualidade do tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) de mesa. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, p.329-335. 2004.

FICKERS, P. Antibiotic Compounds from *Bacillus*: Why are they so Amazing? **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**. Washington. v.8, p.38-43, 2012.

FIEDLER, S.; HEERKLOTZ, H. Vesicle leakage reflects the target selectivity of antimicrobial lipopeptides from *Bacillus subtilis*. **Biophysical Journal**. London v.9, p 2079-2089. 2015.

FILGUEIRA, F.A.R. Novo Manual de Olericultura. **Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa, MG, v.2, p. 193-2014. 2000.

FRANCIS, J.J.; JOHNSTON, M.; ROBERTSON, C.; GLIDEWELL, L.; ENTEWISTIE, V.; ECCLES, M.P.GRIMSHAW, J.M. What is an adequate sample size? Operationalising data saturation for theory-based interview studies. **Psychology Health**. San Francisco, v.25. p.1229-45. 2010.

GALADALLAH, M.A.A. Effects of proline and glycinebetaine on *Vicia faba* response to salt stress. **Biology Plant**. Shenji, v.42, p.249–257. 1999.

GE, B.; LIU, B.; NWET, T. T.; ZHAO, W.; SHI, L.; ZHANG, K. *Bacillus methylotrophicus* Strain NKG-1, isolated from Changbai mountain, China, has potential applications as a biofertilizer or biocontrol agent. **PloS One**. Denver. v.11. p11. 2016.

GLAASKER, E.; TJAN, F.S.; TER STEEG, P.F.; KONINGS, W.N.; POOLMAN, B. Physiological response of *Lactobacillus plantarum* to salt and nonelectrolyte stress. **Journal of bacteriology**. New York, v.180, p.4718–23. 1998.

GUPTA, V.P.; BOCHOW, H.; DOLEJ, S.; FISCHER, I. Plant growth-promoting *Bacillus subtilis* strain as potential inducer of systemic resistance in tomato against Fusarium wilt. **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz**, Brussels, v.107, p.145-154, 2000.

GUPTA, R.; VAKHLU, J. Native *Bacillus amyloliquefaciens* W2 as a potential biocontrol for *Fusarium oxysporum* R1 causing corm rot of *Crocus sativus*. **Eur j Plant pathology**. Amsterdam, v.143, p.123-131. 2015.

GUNASEKERA, T.S.; CSONKA, L.N.; PALIY, O. Genome-wide transcriptional responses of *Escherichia coli* K-12 to continuous osmotic and heat stresses. **Journal of bacteriology**. London, v.190, p.3712–20. 2008.

GOMES, M. J. Gênero *Bacillus* spp. **Tópicos em Bacteriologia Veterinária. FAVET**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. v.1, p. 1-49. 2013.

GONG, X.; ZHANG, J.; LIU, J. A stress responsive gene of *Fortunella crassifolia* FcSISP functions in salt stress resistance. **Plant Physiology and Biochemistry**. Washington. v.83, p.10-19.2014.

GORDON, S.A.; WEBER, R.P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant physiology**. Bethesda, v.26, p. 192-195, 1951.

HAGEMANN, M.; ERDMANN, N. Environmental stresses. In: Rai, A.K. (Ed.), Cyanobacterial Nitrogen Metabolism and Environmental Biotechnology, **Narosa Publishing House**, New Delhi, v.12, p.156–221. 1997.

HAHNE, H.; MADER, U.; OTTO, A.; BONN, F.; STEIL, L.; BREMER, E. A comprehensive proteomics and transcriptomics analysis of *Bacillus subtilis* salt stress adaptation. **Journal of bacteriology**. London, v.192,p-870–82. 2010.

HALFELD-VIEIRA, B.A.; VIEIRA JÚNIOR, J.R.; ROMEIRO, R.S.; SILVA, H.S.A.; BARACAT-PEREIRA, M.C. Induction of systemic resistance in tomato by the autochthonous phylloplane resident *Bacillus cereus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasilia, v.41, p.1247-1252, 2006.

HAMMERSCHMIDT, R.; NUCKLES, E.; KUC, J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**. Davis, v.20, p. 73-80, 1982.

HAO, X. PAPADOPOULOU, A.P.; DORAIS, M; EHRET, D.L.; TURCOTTE, G.; GOSSELIN, A. Improving tomato fruit quality by raising the EC of NFT nutrient solutions and calcium spraying: effects on growth, photosynthesis, yield and quality. **Acta Horticultural** , Dublin, v.511, p.213–224. 2000.

HAYASHI, H.; MURATA, N. Genetically engineered enhancement of salt tolerance in higher plants. **Molecular Mechanisms and molecular regulation**. Amsterdam, v.31, p.133-148. 1998.

HARVEY, M.; QUILLEY, S.; BEYNON, H. Exploring the tomato: transformations of nature, society and economy. **Edward Elgar**. Cheltenham, v.1, p.324. 2002.

HASSANEIN, A.M. Alterations in protein and esterase patterns of peanut in response to salinity stress. **Biology Plant**. Oxford, v.42, 241–248. 1999.

HOFFMANN, T.; SCHUTZ, A.; BROSIUS, M.; VOLKER, U.; BREMER, E. High-salinity-induced iron limitation in *Bacillus subtilis*. **Journal of bacteriology**. London, v.184, p.718–27. 2002.

HOFFMANN, T.; SCHUTZ, A.; BROSIUS, M.; VOLKER, U.; BREMER, E. High-salinity-induced iron limitation in *Bacillus subtilis*. **Journal of bacteriology**. London, v.184,p.718–27. 2013.

HOPER, D.; VOLKER, U.; HECKER, M. Comprehensive characterization of the contribution of individual SigB- dependent general stress genes to stress resistance of *Bacillus subtilis*. **Journal of bacteriology**. London, v.187, p.2810–26. 2005.

HOLANDA, J. S. de; AMORIM, J. R. A. de; FERREIRA NETO, M.; HOLANDA, A. C. de. Qualidade da água para irrigação. In: Gheyi, H. R.; Dias, N. da S.; Lacerda, C. F. de. **Manejo da salinidade na agricultura: estudos básicos e aplicados**. Fortaleza, v.4, p.43-61. 2010.

ISAYEKOV, S.V. Physiological and molecular aspects of salt stress in plants. Moscow. v. 46, p. 302-318. 2012

ISLAM, F.; YASMEEN, T.; ARIF, M.S.; ALI, S.; ALI, B.; HAMEED, S.; ZHOU, W. Plant growth promoting bacteria confer salt tolerance in *Vigna radiata* by up-regulating antioxidant defense and biological soil fertility. **Plant Growth Regulation**. Dublin. v.80, p.23-36.2016.

IRIZARRY, I.; WHITE, J.F. Application of bacteria from non-cultivated plants to promote growth, alter root architecture and alleviate salt stress of cotton. **Journal of Applied Microbiology**. Albuquerque. v.16. p.1364-5072. 2017.

ITO, M.; XU, H.; GUFFANTI, A.A.; WEI, Y. ; ZVI, L.; CLAPHAM, D.E. The voltage gated Na channel NaVBP has a role in motility, chemotaxis, and pH homeostasis of an alkaliphilic *Bacillus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. Washington, v.101,p.10566–71. 2004.

JANTO, B.; AHMED, A.; ITO, M.; LIU, J. HICKS, D.B.; PAGNI, S. Genome of alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* OF4 reveals adaptations that support the ability to grow in an external pH range from 7.5 to 11.4. **Environmental microbiology**. Brussels, v.13, p.3289–309. 2011.

JAMIL, M.R.S.; KUI, J.L.; JEONG, M.K., HYUN SOON, K.I.M., EUI S.R. Salinity reduced growth PS2 photochemistry and chlorophyll content in radish. **Scientia Agricola**. Piracicaba, v.64. p.111-118. 2007.

JASIM, B.; GEETHU, P.R.; RADHAKRISHNAN, R. Effect of endophytic *Bacillus* sp. from selected medicinal plants on growth promotion and diosgenin productions in *Trigonella foenum-graecum*. **Plant cell organic cultivated**. Zurich, v.122, p-565-572. 2015.

JIA, K.; GAO, Y; HUANG, X.; GUO, R.; LI, S. Rhizosphere inhibition of cucumber *Fusarium* wilt by different surfactin-excreting Strains of *Bacillus subtilis*. **The Plant Pathology Journal**. New York. v.31 , p.140-151. 2015.

JHA, Y.; PATEL, S. Combination of endophytic and rhizospheric plant growth promoting rhizobacteria in *Oryza sativa* shows higher accumulation of osmoprotectant against saline stress. **Acta physiology plant**. Shenji, v.33, p.797-

802. 2011.

KANG, S.M.; RADHAKRISHNAN, R.; YOU, Y.H., JOO, G.J.; LEE, I.J.; LEE, K.E., KIM, J.H. Phosphate solubilizing *Bacillus megaterium* mj1212 regulates endogenous plant carbohydrates and amino acids contents to promote mustard plant growth. **Indian Journal Microbiology**. Mumbai, v.54, p. 427–433. 2012.

KANG, S. M.; RADHAKRISHNAN, R.; LEE, I.L. *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *Plantarum* GR53, a potent biocontrol agent resists *Rhizoctonia* disease on Chinese cabbage through hormonal and antioxidants regulation. **World Journal Microbiol Biotechnol**. Nova York, v.31, p.10, 2014.

KEMPF, B.; BREMER, E. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. **Archives of microbiology**. Guelph, v.170, p.319–30. 1998.

KHAN, M.A. Experimental assessment of salinity tolerance of *Ceriops tagal* seedlings and saplings from Indus delta, Pakistan. **Aquatic Botany**. San Diego, v.79, p.259-268. 2001.

KHARITONOVA, M.A.; KIPENSKAYA, L.V.; ILINSKAYA, O. N. Activation of Biosynthesis of Guanyl-specific ribonuclease secreted by *Bacillus circulans* under salt stress. **Molecular Biology**. Saint Petesburg. v. 50, p. 874-879. 2016.

KIM, Y.G.; KANG, H.K.; KWON, K.; SEO, C.H.; LEE, H.B. PARK, Y. Antagonistic Activities of novel peptides from *Bacillus amyloliquefaciens* PT14 against *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum*. **Journal agricultural food chemise**. Beijin, v.63, p.10380-10387. 2015.

KIM, M.; RADHAKRISHNAN, R.; KANG, S.; YOU, Y.; JEONG, E.; KIM, J.; LEE, I. Plant growth promoting effect of *Bacillus amyloliquefaciens* H-2-5 on crop plants and influence on physiological changes in soybean under soil salinity. **Physiology Molecular Biology Plants**. London .v.23, p571-580. 2017.

KITADA, M; HASHIMOTO, M.; KUDO, T.; HORIKOSHI, K. Properties of two different Na⁺/H⁺ antiport systems in alkaliphilic *Bacillus* sp. strain C-125. **Journal of bacteriology**. London v.176, p.6464–9. 1994.

KEFI, A.; SLIMENE, I. B.; RIHOUEY, C.; AZAIZ, S.; BEAJAOU, M.; BELAID, R. COSSET, P.; JOUENNE, T.; LIMAM, F. Characterization of endophytic *Bacillus* strains from tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) displaying antifungal activity against *Botrytis cinerea* Pers. **World Journal Microbiol Biotechnol**. Amsterdam. v.31, p.1967-1976. 2015.

KLEIN, M. N.; SILVA, A., C.; KUPPER, K., C. *Bacillus subtilis* based-formulation for the control of postbloom fruit drop of citrus. **World Journal Microbiol Biotechnol**. Amsterdam, v.32 , p.205. 2016.

KRONZUCKER H.J.; BRITTO, D.T. Sodium transport in plants: a critical review. **New Phytologist**. London, v.189, 54–81. 2011.

KURATA, A.; YAMAURA, Y.; TANAKA, T.; KATO, C.; NAKASONE, K.; KISHIMOTO, N. Antifungal peptidic compound from the deep-sea bacterium *Aneurinibacillus* sp. YR247. **World Journal Microbiol Biotechnol**. Amsterdam, p.33 a 73. 2017.

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

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

LENTEREN, J. C.; BOLCKMANS, K.; KOHL, J.; RAVENSBERG, W. J.; URBANEJA, A. Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. **BioControl**. Amsterdam. v.4, p.1. 2017.

LIMA, E. F.; NETO, V.P.; ARAUJO, J.M.; ALCANTARA, F. BONIFACIO, A. RODRIGUES, A.C. Variedades de feijão-fava exibem diferentes respostas de crescimento quando inoculadas com *Bacillus* sp. uma bactéria promotora de crescimento em plantas. **Bioscience journal**, Berlin, v.32, p.1221-1233. 2016.

LIMA, R.B.; SANTOS, T. B.; VIEIRA, L. G. E.; FERRARESE, M.L.L.; FERRARESE-FILHO, O.; DONATTI, L.; BOEGER, M.R.T.; PETKOWICZ, C. L. O. Salt stress alters the cell wall polysaccharides and anatomy of coffee (*Coffea arabica* L.) leaf cells. **Carbohydrate Polymers**. Nova York. v.112, p-686-694. 2014.

LONGSTRETH, D.J.; NOBEL, P.S. Salinity effects on leaf anatomy. **Plant physiology**. Saint Petersburg, v.63, p.700-703. 1979.

LOPEZ, C.S.; ALICE, A. F.; HERAS, H.; RIVAS, E.A.; SANCHEZ-RIVAS. Role of anionic phospholipids in the adaptation of *Bacillus subtilis* to high salinity. **Microbiology**. New York, v.152, p.605–16. 2006.

LORET, J.; BOLANOS, L.; LUCAS, M.M.; PEART, J.M.; BREWIN, N.J.; BONILLA, I. Ionic stress and osmotic pressure induce different alterations in the lipopolysaccharide of a *Rhizobium meliloti* strain. **Applied and environmental microbiology**. Manitoba, v.61, p.3701–4. 1995.

LUGTENBERG, B; KAMILOVA, F. Plant-growth-Promoting Rhizobacteria. **Annual Review Microbiology**. Oxford, 63, P. 541-56. 2009.

LUCAS, R.F.J.; TAVARES, M.H.; CARDOSO, L.D.; CASSARO, F.A. Curva de retenção de água no solo pelo método do papel-filtro. **Revista Brasileira de Ciências do solo**. Viçosa, v.35, p.1957-1975. 2011.

LOPEZ, C. S.; HERAS, H.; RUZAL, S. M.; SANCHEZ-RIVAS, C.; RIVAS, E.A. Variations of the envelope composition of *Bacillus subtilis* during growth in hyperosmotic medium. **Current microbiology**. Denver, v.36, p.55–61.1998.

- MANJULA, K.; PODILE, A.R. Increase in seedling emergence and dry weight of pigeon pea the field with chitin-supplemented formulations of *Bacillus subtilis* AF 1. **Word jornal of Microbiology e Biotechnology**. London, v.21, p.1057-1062. 2005.
- MAAS, E. V.; HOFFMAN, G. J. Crop salt tolerance Current Assessment. **Journal of Irrigation and Drainage Division**. Zurich, v.103, p.115-134, 1977.
- MASS, E.V. Salt tolerance of plants. **Applied Agricultural**, Albuquerque, v.1, p.12–26. 1986.
- MARKOVICH, N.A.; KONONOVA, G.L. Lytic enzymes of *Trichoderma* and their role in plant defense from fungal diseases: a review. **Applied Biochemical Microbiology**, Atlanta, v.39, p.341–351. 2003.
- MAROUELLI, W.A.; SILVA, W.L.C.; SILVA, H.R.; VILELA, N.J. Eficiência econômica do manejo racional da irrigação em tomateiro para processamento industrial . **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.18, p. 238-243. 2012.
- MAYAK, S.; TIROSH, T.; GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. **Plant physiology and biochemistry**. Santa fé, v. 42, p.565-572. 2004.
- MEDEIROS, P.R.F.; DUARTE, S.N.; UYEDA, C.A.; SILVA, E.F.F; MEDEIROS, J.F. Tolerância da cultura do tomate à salinidade do solo em ambiente protegido. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. Campina Grande. v.16, p.51-55. 2012.
- MELONI, D. A.; OLIVA, M. A.; MARTINEZ, C. A.; CAMBRAIA, J. Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. **Environmental and Experimental Botany**, Paris, v. 49, p. 69-76. 2003.
- MERCHANT, A.; ADAMS, M. Stable osmotic in *Eucalyptus spathulata* – responses to salt and water deficit stress. **Functional Plant Biology**, Victoria, v.32, n.9, p.797-805, 2005.
- MIRANDA, F.R.; LINDEMBERG, A; MARTINS, M.V.V.; FERNANDES, C.M.F.; EVANGELISTA, M.I.; SOUSA, A.A.P. Produção de tomate em substrato de fibra de coco. **Circular Técnica EMBRAPA**, Brasília, v.33, p.5. 2011.
- MOHIDIN F.A., KHAN M.R., KHAN S.M., BHAT B.H. Why *Trichoderma* is considered super hero (super fungus) against the evil parasites?. **Plant Pathology Journal**. New York, v.9, p.92-102. 2010.
- MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 28, p. 239-250, 2002.
- MUNNS, R.; TERMATT, A. Whole plant responses to salinity. **Aust. J. plant physiol.** v.13, p.143-160. 1986. **AGRODOK 17**. Wagenigen, v.17, p.1-104. 2006.

NAIKA, S.; JEUDE, J.V.L.; GOFFAU, M.; HILMI, M.; DAM, B.V. A cultura do tomate: produção, processamento e comercialização.

NAKANO, O. As pragas das hortaliças: seu controle e o selo verde. **Horticultura Brasileira**. Brasília, v.17, p.4-5. 1999.

NASH, S.M. & SNYDER, W.C. Quantitative estimations by plate counts of propagules of the bean root rot *Fusarium* in field soil. **Phytopathology**. London, v.52, p.567-572. 1962.

NAUTYUIAL C.S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphorus solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology**, Baton Rouge, v.170,p.2017-2021. 1999.

NIU, X.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M.; PARDO, J. M. Ion homeostasis in NaCl stress environments. **Plant Physiology**, Lancaster, v.109, n.2, p.735-742, 1995.

ONGENA, M.; DUBY, F.; JOURDAN, E.; BEAUDRY, T.; JADIN, V.; DOMMES, J.; THONART, P. *Bacillus subtilis* M4 decreases plant susceptibility towards fungal pathogens by increasing host resistance associated with differential gene expression. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Brussels, v.67, 692-698. 2005.

ONGENA, M.; JOURDAN, E.; ADAM, A.; PAQUOT, M.; BRANS, A.; JORIS, B.; ARPIGNY, J.; THONART, P. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. **Environmental Microbiology**. Brussels, v.4, p.1084-1090. 2007.

PACHECO, C. M.; PESTANA-CALSA, M. C.; GOZZO, F.C.; NOGUEIRA, R. J. M. C.; MENOSSI, M. JUNIOR CALSA, T. Differentially Delayed Root Proteome Responses to Salt Stress in Sugar Cane Varieties. **Journal of proteome research**. Portland. v.12, p-5681-5695. 2013.

PANE, C.; ZACCARDELLI, M. Evaluation of *Bacillus* strains isolated from solanaceous phylloplane for biocontrol of *Alternaria* early blight of tomato. **Biological Control**. London. v.84, p.11 a 18. 2015.

PARREIRA, D. F.; NEVES, W. S.; ZAMBOLIM, L. Resistência de fungos a fungicidas inibidores de quinona. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadinha, v. 3, n. 2, p. 24-34, 2009.

PARIDA, A. K.; DAS, A. B. Effects of NaCl stress on nitrogen and phosphorous metabolism in a true mangrove *Bruguiera parviflora* grown under hydroponic culture. **Journal plant physiology**, New York, v.161, p.921-928. 2004.

PARIDA, A.K.; DAS, A. B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. **Ecotoxicology and environmental safety**. Chicago, v.60, p.324-349. 2005.

PASCHOLATI, S. F.; NICHOLSON, R. L.; BUTLER, L. G. Phenylalanine ammonia-lyase activity and anthocyanin accumulation in wounded maize mesocotyls. **Journal**

of **Phytopathology**, Portland, v.115, p. 165-172, 1986.

PATEL, S.; SARAF, M. Interaction of root colonizing biocontrol agents demonstrates the antagonistic effect against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* on tomato. **Eur. Journal Plant pathology**. North Dakota, v. 149, p.425-433. 2017.

PINHO, R.S.C.; CAMPOS, V.P.; SOUSA, R.M.; SILVA, J.R.C.; OLIVEIRA, M.S. PIMENTEL, G.C.S.; COSTA, L.S.A.S. Efeito de bactérias endofíticas no controle de *Meloidogyne incognita* e sua capacidade de colonização de raízes de tomateiro. **Nematologia brasileira**. Piracicaba, v.54, p.1. 2009.

PIOTTO, F. A.; PERES, L. E. P. Base genética do hábito de crescimento e florescimento em tomateiro e sua importância na agricultura. Santa Maria, **Ciência Rural**. Santa Maria, v.42, p. 1941-1946. 2012.

PRISCO, J. T. Alguns aspectos da fisiologia do estresse salino. **Revista Brasileira de Botânica**. São Paulo, v.3, p.85-94, 1987.

PUNJA, Z.K.; RODRIGUEZ, G.; TIRAJOH, A. Effects of *Bacillus subtilis* strain QST 713 and storage temperatures on post-harvest disease development on greenhouse tomatoes. **Crop Protection**. New York, v.84, p. 98-104. 2016.

QIU, Y.; WEN, H.; AO, J.; ZHANG, M.; LI, F. Soy 14-3-3 protein SGF14c, a new regulator of tolerance to salt-alkali stress. **Plant Biotechnol Report**. Seoul. v. 9, p. 369-377. 2015.

RAWAT, L.; SINGH, N.; SHUKLA, N.; KUMAR, J. Seed Biopriming with salinity tolerant isolates of *Trichoderma harzianum* alleviates salt stress in rice: growth, physiological and biochemical characteristics. **Journal of plant pathology**. Denver, v.94, p-353-365. 2012.

REIS FILHO, J. S.; MARIN, J. O. B.; FERNANDES, P.M. Os agrotóxicos na produção de tomate de mesa na região de Goianópolis. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 39, p. 307-316. 2009.

RYAN, R.P.; GERMAINE, K.; FRANKS, A.; RYAN, D.J.; DOWLING, D.N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS Microbiology Letters**, Davis, v.278, p.1-9, 2008.

ROMEIRO, R.S.; LANNA-FILHO, R.; VIEIRA, J.R.; SILVA, H.S.A.; BARACAT-PEREIRA, M.C.; CARVALHO, M.G. Macromolecules released by a plant growth-promoting rhizobacterium as elicitors of systemic resistance in tomato to bacterial and fungal pathogens. **Journal of Phytopathology**, Dublin, v.153, p.120-123. 2005.

ROMEROANDA, R.; SORIA, T.; CUARTERO, J. Tomato plant-water uptake?? and plant-water relationships under saline growth conditions. **Plant Science**, London v. 160, p.265-272. 2001.

RUIZ, M. S.; YASUOR, H.; BEN-GAL, A.; YERMIYAHU, U.; SARANGA, Y.; ELBAUM, R. Salinity induced fruit hypodermis thickening alters the texture of tomato

(*Solanum lycopersicum* Mill) fruits. **Scientia Horticulturae**. Paris, v.192. p.244-249. 2015.

SAMANTA, R.; PAL, D.; SEM, S.P. Production of hydrolases by N₂-fixing microorganisms. **Biochemie and Physiologie der pflanzen**. Fena, v.185, p.75-81. 1989.

SANTOS, A. P. Controle do Oídio da abobrinha com antagonistas e produtos biocompatíveis. **Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)**, Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2009.

SCHROEDER, J.I.; DELHAIZE, E.; FROEMMER, W.B. Using membrane transporters to improve crops for sustainable food production. **Nature**. London. v.497, p.60–66. 2013.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J.B. Universal assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**. New York, v. 160, p. 47-56. 1987.

SHAHZAD, R. ; KHAN, A.L.; SAQUIB, B.; ASAF, S.; LEE, I. Plant growth promoting endophytic bacteria versus pathogenic infections: an example of *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato. **Peer j**. Lille, v.5, p.3107. 2017.

SHALATA, A.; MITTOVA, V.; VOLOKITA, M.; GUY, M.; TAL, M. Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt dependent oxidative stress: The root antioxidative system. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.112, n.3, p.487-494, 2001.

SON, S.; KO, A.; JANG, M.; KIM, J.W.; KIM, G.S.; LEE, J. K. JEON, E. S.; FUTAMURA, Y.; RYOO, I.; LEE, J.; OH, H.; HONG, Y.; KIM, B, Y.; TAKAHASHI, S. OSADA, H. JANG, J. AHN, J. S. New cyclic lipopeptides of the iturin class produced by saltern-Derived *Bacillus* sp. KCB14S006. **Marine drugs**. Nova York. v. 14, p.4. 2016.

SORKEHEH K.; SHIRAN B.; KHODABAMSHI, M., ROUHI, V.; MOSAVEI S.; SOFO, A. Exogenous proline alleviates the effects of H₂O₂-induced oxidative stress in wild almond species. **Russian Journal Plant Physiology**. Moscou, v59, 788–798. 2012.

SOUCHIE, E. L.; ABBOUD, A. C. S.; CAPRONI, A. L. Solubilização de Fosfato *in vitro* por microrganismos rizosférico de Guandu. **Bioscience Journal**. Uberlandia, v. 23, p. 53-60. 2007.

SOHAN, D.; JASONI, R.; ZAJICEK, J. Plant–water relations of NaCl and calcium treated sunflower plants. **Environmental and Experimental Botany**, Paris, v.42, n.1, p.105-111, 1999.

STRAGIER, P.; LOSICK, R.. Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis*. **Annual Reviews of Genetics**, New York, v.30, p.297-341, 1996.

SUN, C.; GAO, X.; FU, J.; ZHOU, J.; WU, X. Metabolic response of maize (*Zea mays* L.) plants to combined drought and salt stress. **Plant Soil**. New York. v.388. p.99-

117. 2015.

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

TIWARI, S.; PRASAD, V.; CHAUHAN, P. S.; LATA, C. *Bacillus amyloliquefaciens* confers tolerance to various abiotic stresses and modulates plant response to phytohormones through osmoprotection and gene expression regulation in rice. **Frontiers in Plant Science**. Nova York. v.15, p.510. 2017.

TOKESHI, H.; GALLI, F. Variabilidade de *Fusarium f. lycopersici* Sny & Hans em São Paulo. **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**, Piracicaba, v. 23, p. 217-227, 1967.

TORRES, M. J.; BRANDAN, C. P.; SABATÉ, D. C.; PETROSELLI, G.; ERRA-BALSELLS, R.; AUDISIO, M. C. Biological activity of the lipopeptide-producing *Bacillus amyloliquefaciens* PGPBacCA1 on common bean *Phaseolus vulgaris* L. pathogens. **Biological Control**, San Diego, v. 105, p. 93-99. 2017.

TSUZUKI, M.; MOSKVIN, O.V.; KURIBAYASHI, M.; SATO, K.; RETAMAL, S.; ABO, M. Salt stress-induced changes in the transcriptome, compatible solutes, and membrane lipids in the facultatively phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. **Applied and environmental microbiology**. San Diego, v.77, p.21. 2011.

XIONG, J; ZHOU, Q.; LUO, H. Systemic nematicidal activity and biocontrol of *Bacillus firmus* against the root-knot nematode *Meloidogyne icognita*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Shenji, v31, p. 661-667. 2015.

YACHANA, J.; SUBRAMANIAN, R.B.; PATEL, S. Combination of endophytic and rhizospheric plant growth promoting rhizobacteria in *Oryza sativa* shows higher accumulation of osmoprotectant against saline stress. **Acta Physiological Plant**. Gurajat. v. 33, p. 797-802. 2011.

YAMAMOTO, S. SHIRAISHI, S.; KAWAGOE, Y. Impact of *Bacillus amyloliquefaciens* S13-3 on control of bacterial wilt and powdery mildew in tomato. **Pest Management Science**. Avignon. v.71, p.722 a 727. 2014.

YARULLINA, L.G.; KASIMANOVA, R.I.; IBRAGIMOV, R.I.; AKHATOVA, A.R.; UMAROV, I.A.; MAKSIMOV, I.V. Qualitative and quantitative changes of potato tuber proteome under the influence of signal molecules and infection with *Phytophthora infestans*. **Applied Biochemistry and Microbiology**. London, v.52, p. 71 a 78. 2016.

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

YIN, L.; XUE, Y. MA, Y. Global microarray analysis of alkaliphilic halotolerant bacterium *Bacillus* sp. N16-5 salt stress adaptation. **PloS One**. New York, v.6, p.16.

2015.

WANG, T.; LIU, M.Q.; LI, H.X. Inoculation of phosphate solubilizing bacteria *Bacillus thuringiensis* B1 increases available phosphorus and growth of peanut in acidic soil. **Acta Agricultural Soil Plant**. Rome, v.64, p.252–259. 2014.

WICK, L.M.; EGLI, T. Molecular components of physiological stress responses in *Escherichia coli*. **Advances in biochemical engineering/biotechnology**. Oxford, v. 89, p.1-45. 2004.

ZALILA-KOLSI, I.; MAHMOUD, A.B., ALI, H. SELLAMI, S.; NASFI, Z. TOUNSI, S.; JAMOSSI, K. Antagonist effects of *Bacillus* spp. strains against *Fusarium graminearum* for protection of durum wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *Durum*). **Microbiological research**. Washington, v. 192, p. 148-158. 2016.

ZHANG, X.; LI, B.; WANG, Y.; GUO, Q.; LU, X.; LI, S.; MA, P. Lipopeptides, a novel protein, and volatile compounds contribute to the antifungal activity of the biocontrol agent *Bacillus atrophaeus* CAB-1. **Applied Microbiology and Biotechnology**. Shenji. v.21.p.9525-9534. 2013.

ZHANG, J; LI, Y.; YUAN, H.; SUN, B.; LI, H. Biological control of the cereal cyst nematode (*Heterodera filipjevi*) by *Achromobacter xylosoxidans* isolate 09X01 and *Bacillus cereus* isolate 09B18 . **Biological Control**. Amsterdam, v.92, p.1–6 , 2016.

ZHANG, H.Z.; LINKS, P.; NGSEE, J., TRAN, K.; KO, Z. YAO, Z. Localization of LDL Receptor-related Protein 1 (LRP1) to caveolae L1 Adipocytes in response to insulin treatment. **The American Society for Biochemistry and Molecular Biology**. Washington, v.82, p.15–20. 2015.

ZIDAN, I.; AZAIZEH, H.; NEWMANN, P. M. Does salinity reduce growth in maize root epidermal cells by inhibiting their capacity for cell wall acidification? **Plant Physiology**, Lancaster, v.93, n.1, p.7-11, 1990.

ZOUARI, I.; JLAIEL, L. TOUNSI, S.; TRIGUI, M. Biocontrol activity of the endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* strain CEIZ-11 against *Pythium aphanidermatum* and purification of its bioactive compounds. **Biological Control**. London. v.100, p.54 a 62. 2016.

ZWICK, J, V.; NOBLE, S.; YASSER, K. E.; COE, G. D.; HAKEY, D., J.; KING, N. A.; SADAUSKAS, A. FAULKNER, M. AhlpA is a peroxidase expressed during biofilm formation in *Bacillus subtilis*. **Microbiology Open**. Zurich, v.3, p.403. 2016.