

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOLOGIA
DOUTORADO EM AGROECOLOGIA

JOSÉ RIBAMAR MUNIZ CAMPOS NETO

**FORMULAÇÕES DE *Bacillus methylotrophicus* NA PROMOÇÃO DO
CRESCIMENTO E INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM TOMATEIRO CONTRA
MURCHA DE *FUSARIUM***

São Luís – MA

2018

JOSÉ RIBAMAR MUNIZ CAMPOS NETO

Engenheiro Agrônomo

**FORMULAÇÕES DE *Bacillus methylotrophicus* NA PROMOÇÃO DO
CRESCIMENTO E INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM TOMATEIRO CONTRA
MURCHA DE *FUSARIUM***

Defesa de Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agroecologia da Universidade Estadual do Maranhão, como parte dos requisitos para obtenção de título de Doutor em Agroecologia.

Orientadora: Profa. Dra. Antônia Alice Costa Rodrigues

São Luís – MA

2018

Campos Neto, José Ribamar Muniz.

Formulações de *Bacillus methylotrophicus* na promoção de crescimento e indução de resistência em tomateiro contra murcha de fusarium / José Ribamar Muniz Campos Neto.– São Luís, 2018.

95 f

Tese (Doutorado) – Curso de Agroecologia, Universidade Estadual do Maranhão, 2018.

Orientador: Profa. Antônia Alice Costa Rodrigues.

1.Controle biológico. 2.Rizobactérias. 3.Ativação enzimática. I.Título

CDU: 635.64-293.7

JOSÉ RIBAMAR MUNIZ CAMPOS NETO

**FORMULAÇÕES DE *Bacillus methylotrophicus* NA PROMOÇÃO DO
CRESCIMENTO E INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM TOMATEIRO CONTRA
MURCHA DE *FUSARIUM***

Aprovado em 22 de agosto de 2018

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Antônia Alice Costa Rodrigues (Orientadora)

Universidade Estadual do Maranhão - UEMA

Dr. Guilherme Barbosa Abreu (1º examinador)

Embrapa Cocais

Prof. Dr. Altamiro Ferraz Júnior (2º examinador)

Universidade Estadual do Maranhão - UEMA

Prof.º Dr. Cláudio Belmino Maia (2º examinador)

Universidade Estadual do Maranhão – UEMA

Prof.º Dr. Fabrício de Oliveira Reis (3º examinador)

Universidade Estadual do Maranhão - UEMA

Dedico

Ao meus pais,
Mauro Luís Bayma do Lago Araújo,
por uma vida de dedicação e amor incondicional aos filhos,
e Cláudia Lúcia Moreira Campos,
pelo incentivo, carinho orientação e amor.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por sempre iluminar minha vida, direcionar meus passos e acreditar no meu Eu.

À **Universidade Estadual do Maranhão**, por meio da Coordenação do Programa de Pós-graduação em Agroecologia, pelas oportunidades, experiências e apoio.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Maranhão – FAPEMA**, que financiou este projeto de pesquisa, tornou essa pesquisa possível.

À minha orientadora, Professora Dra. **Antônia Alice Costa Rodrigues**, pela orientação, pelo incentivo e dedicação. Por acreditar na minha capacidade e participar na formação do meu caráter.

Aos **meus pais**, pelo constante incentivo e incondicional amor ministrado.

Em especial à minha esposa e companheira **Larissa Brandão Portela** que, mesmo com as responsabilidades do matrimônio e paternidade, mostrou-se tão compreensiva em minhas ausências, sempre me estimulando em continuar e estando presente nos momentos mais difíceis.

Aos meus colegas e amigos do **Laboratório de Fitopatologia da UEMA**, pela ajuda, companheirismo e pelos momentos de alegria compartilhados. Muito mais que uma equipe, uma verdadeira família.

Aos meus grandes amigos **Diogo Herison Silva Sardinha** e **Vinicius Ribamar Alencar Macedo**, pela amizade e companheirismo, auxiliando na realização do trabalho e trocando conhecimentos, receios e vitórias inerente ao Doutorado.

À toda minha família e amigos, que sempre acreditaram no meu potencial, incentivando e dando forças nos momentos difíceis.

A todos os colegas e amigos do Doutorado em Agroecologia da Universidade Estadual do Maranhão, reforçando que tais laços dão sustentação e incentivo na realização das atividades.

Utopía

“[...] ella está en el horizonte.

Me acerco dos pasos, ella se aleja dos pasos.

Camino diez pasos y el horizonte se corre diez pasos más allá.

Por mucho que yo camine, nunca la alcanzaré.

Para que sirve la utopía? Para eso sirve: para caminhar!”

Fernando Birri apud Eduardo Galeano

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – REFERENCIAL TEÓRICO	7
O Hospedeiro: Tomate.....	8
O Patógeno: Fusarium	10
Descrição da Doença: Fusariose do Tomateiro	11
Estratégias de Manejo de Doenças	13
Indução de Resistência	14
Mecanismos Bioquímicos Envolvidos na Indução de Resistência.....	17
Promoção do crescimento vegetal por rizobactérias e o controle de fitopatógenos.....	19
REFERÊNCIAS	22
CAPÍTULO 2 – BACTERIAL FORMULATIONS IN INDUCTION OF RESISTANCE AND GROWTH PROMOTION OF TOMATO PLANTS	35
ABSTRACT	36
INTRODUCTION	37
MATERIAL AND METHODS.....	38
RESULTS	38
DISCUSSION.....	43
CONCLUSIONS	44
ACKNOWLEDGMENTS	44
REFERENCES	44
CAPÍTULO 3 – INDOLE ACETIC ACID PRODUCTION AND GROWTH PROMOTION OF TOMATO PLANTS BY BACTERIAL FORMULATIONS	47
ABSTRACT	49
INTRODUCTION	50
RESULTS	51
DISCUSSION.....	52
MATERIAL AND METHODS.....	54
CONCLUSIONS	56
ACKNOWLEDGMENTS	56
REFERENCES	56

CAPÍTULO 4 – RELATÓRIO DESCRITIVO DE PATENTE DE INVENÇÃO: COMPOSIÇÃO DE BIOFERTILIZANTE PARA A PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E CONTROLE DE FITOPATÓGENOS EM OLERÍCOLAS.....	62
RELATÓRIO DESCRITIVO DE PATENTE DE INVENÇÃO	63
Campo da Invenção	64
Sumário da Invenção	64
Descrição Detalhada da Invenção.....	65
Reinvindicações.....	81
Resumo	81
REFERÊNCIAS	82
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	85
ANEXOS	86
NORMAS DA REVISTA AUSTRALIAN JOURNAL OF CROP SCIENCE	88
SUBMISSÃO DO ARTIGO – CAPÍTULO 03	92



CAPÍTULO 1

REFERENCIAL TEÓRICO



CAPÍTULO 1 – REFERENCIAL TEÓRICO

O Brasil é um dos principais produtores de tomate, com uma produção superior a 4,4 milhões de toneladas. O Nordeste destaca-se como a terceira região produtora deste fruto, produzindo 622.215 toneladas, sendo o Estado do Maranhão o sexto em produção, com pouco mais de 3,9 mil toneladas em 193 hectares de área colhida (IBGE, 2015).

Embora se reconheça o potencial da tomaticultura, sabe-se que esta cultura está sujeita à ocorrência de várias doenças influenciadas, por exemplo, pelo clima, tipo da cultivar plantada, qualidade da semente, tipo de solo, manejo da cultura, dentre outros, que, somados à escassez de medidas eficientes de controle de patógenos, podem inviabilizar a produção.

Entre as doenças de importância econômica que afetam o tomateiro destaca-se a Fusariose do tomateiro causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *lycopersici* Snyder; Hansen (KUROSAWA; PAVAN, 1997; JULIATTI, 2001; SOTOYAMA et al., 2016; KUMAR et al., 2017).

A deficiência no controle desta doença, associada às condições ambientais favoráveis ao fungo, inviabilizam economicamente o cultivo do tomate no Estado do Maranhão. Tal situação eleva o custo da produção, diminui a acessibilidade da população e exige a importação desta hortaliça de outros Estados, acarretando prejuízos para o produtor local e ônus ao consumidor, o que reflete de forma negativa na cadeia produtiva.

Além disso, há uma necessidade urgente de aceitação mundial do uso de agentes biológicos para o controle de doenças, parcialmente em resposta à preocupação pública com o uso de pesticidas químicos tóxicos, às vezes em violação da legislação existente, conforme observado no relatório da ANVISA (2016), mas também para o controle de doenças que não podem ou são parcialmente gerenciadas por outras estratégias de controle.

O uso de cultivares resistente constitui o método mais eficiente de controle desta doença, contudo existem algumas limitações como o nível de resistência parcial e quase sempre não está disponível aos produtores, principalmente no estado do Maranhão. Em face de indisponibilidade de cultivares de tomateiro com resistência a Fusariose do tomateiro e, em alguns casos, a necessidade do uso de cultivares suscetíveis mais produtivas, métodos de controle alternativos devem ser pesquisados.

As medidas de controle da doença, sejam culturais ou que tenham como base o uso de produtos químicos, são pouco efetivas e com elevados custos, acarretando ônus na produção (JONES; WOLTZ, 1981). O uso de agroquímicos causa danos irreversíveis ao meio ambiente e à saúde do homem. Sistemas de produção alternativos ou não convencionais podem ser

importantes em reduzir os impactos ambientais e sociais causados pelo atual modelo de produção agrícola. Com a introdução desses sistemas, reduzem-se os riscos de poluição e de intoxicação de operadores, consumidores e meio ambiente (PAUL; LADE, 2014; PRATHAP; RANJITHA-KUMARI, 2014).

Nesse contexto, a resistência sistêmica adquirida (RSA) pode ser uma alternativa viável no controle da Fusariose do tomateiro a RSA resulta da ativação do sistema de defesa da planta, por elicitores bióticos e/ou abióticos, com a indução e expressão de mecanismos relacionados com a produção de substâncias tóxicas ao patógeno e/ou formação de barreiras estruturais que restringem a colonização dos tecidos (KUĆ, 2001; CHITHRASHREE et al., 2011; CHOWDAPPA et al., 2013; PAUL; LADE, 2014; BOUKERMA et al., 2017).

Como alternativas promissoras, rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR) têm sido relatadas como protetores hospedeiros contra infecções fúngicas (DROBY et al., 2009; SOTOYAMA et al., 2016; BOUKERMA et al., 2017). Além disso, foi relatado que o PGPR pode aumentar a atividade de enzimas relacionadas à defesa de plantas e aumentar a expressão gênica (KIM et al., 2015; SHAHZAD et al., 2017). Além disso, a pesquisa também mostra que o PGPR tem ampla atividade antifúngica (SOTOYAMA et al., 2016).

Isolados de *Bacillus* vem se destacando como controladores biológicos contra murcha de *Fusarium* em tomateiro, agindo como indutores de resistência contra a doença a partir da expressão de genes de defesa relacionada com a produção de quitinases, glucanases, peroxidases, dentre outras enzimas relacionadas com a patogenicidade (VAIKUNTAPU et al., 2014; AKRAM et al., 2015; SOTOYAMA et al., 2016)

Assim o uso de PGPR's como promotoras de crescimento vegetal e de indutores de resistência a doenças caracteriza uma medida alternativa, buscando o desenvolvimento sustentável dentro dos princípios agroecológicos proporcionando uma significativa redução dos impactos ambientais que os agroquímicos vêm causando ao longo dos anos.

Na perspectiva de mudar o panorama no qual se encontra o Estado do Maranhão, em relação à produção de tomate e o desequilíbrio ambiental, buscou-se estudar a promoção de crescimento vegetal, aliada a indução de resistência contra patógenos, como alternativa ecológica no controle da fusariose do tomateiro, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, validando o processo indutivo pela avaliação qualitativa e quantitativa das enzimas envolvidas no processo de redução da severidade da doença, além da quantificação de fitohormônios como parâmetro bioquímico para a promoção de crescimento.

O Hospedeiro: Tomate

O tomate é uma hortaliça muito popular na gastronomia mundial. Pode ser consumido *in natura* ou em derivados, sendo apreciado em vários países, tanto pela qualidade de sabor, quanto também pela grande concentração de substâncias benéficas ao organismo humano, como por exemplo o licopeno, que está associada à prevenção do câncer de próstata (LOPES, 2005).

O tomateiro pertence à classe Dicotyledoneae, ordem Tubiflorae e família Solanaceae. Originalmente, de acordo com Linnaeus, o tomateiro foi inicialmente integrado ao gênero *Solanum*, recebendo a denominação *Solanum lycopersicon* L.. Entretanto em 1754, Miller, reclassificou o tomateiro, criando um novo gênero denominado *Lycopersicon*, renomeando o tomateiro cultivado como *Lycopersicon esculentum* Mill. (ALVARENGA, 2004). Contudo, estudos baseados em técnicas moleculares utilizando DNA mitocondrial, demonstraram que os tomateiros e as espécies do gênero *Solanum*, tais como as batatas, estão muito relacionados filogeneticamente, apoiando desta forma a inclusão das espécies de tomate novamente dentro do gênero *Solanum*, retornando para a nomenclatura inicialmente imposta por Linnaeus (*S. lycopersicon* L.), gerando muitas divergências entre botânicos adeptos à taxonomia clássica e adeptos de técnicas mais modernas (PERALTA; SPOONER, 2000).

A floração e a frutificação ocorrem juntamente com o crescimento vegetativo. As folhas pecioladas são compostas por números ímpares de folíolos. Possui sistema radicular constituído de raiz principal, raízes secundárias e raízes adventícias (ALVARENGA, 2004). A planta apresenta dois hábitos de crescimento que condiciona o tipo de cultura: o indeterminado, caracterizado pelo crescimento rasteiro e com produção voltada ao aproveitamento industrial, e o determinado, que possui crescimento ereto e é comumente consumido “*in natura*”. As flores agrupam-se em cachos e são hermafroditas. Normalmente a planta é autopolinizada, apresentando baixa incidência de frutos.

Os frutos são bagas carnosas e suculentas, bi, tri ou plurilocular, que se desenvolve a partir de um ovário com 5-10 mg de peso e alcança, quando maduro, peso final entre 5 e 500 g, dependendo da cultivar e das condições de desenvolvimento (ALVARENGA, 2004). Após amadurecimento, são de um vermelho vivo em razão do acúmulo do carotenóide licopeno. As sementes são pilosas pequenas e o sistema radicular é condicionado pelo tipo de cultura (FILGUEIRA, 2000).

Em 2011, o Brasil produziu 4,4 milhões de toneladas de tomate, havendo um aumento tanto da produção quanto na área plantada da cultura em relação ao ano de 2010. A região Nordeste destacou-se como a terceira maior produtora, com uma produção de 622.215 toneladas

deste fruto. Dentre os Estados do Nordeste, o Maranhão ocupa a 6^o posição na produção de tomate com 3,9 mil toneladas em 193 hectares de área plantada (IBGE, 2015).

O Patógeno: *Fusarium*

O gênero *Fusarium* pertence atualmente ao filo Ascomycota, classe Ascomycetes e ordem Hypocreales. Espécies fitopatogênicas distribuídas dentro do gênero *Fusarium*, dentre as quais *F. oxysporum*, tem sua fase teleomórfica desconhecida, sendo uma espécie grupo composta de dezenas de espécies que necessitam ser claramente definidas e separadas de maneira adequada. Além de importante patógeno de planta, *F. oxysporum* tem sido associado com várias doenças humanas que incluem infecções da córnea, diversos tipos de dermatites, infecções localizadas e sistêmicas (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

As espécies de *Fusarium* que causam murchas vasculares em plantas são todas classificadas como *Fusarium oxysporum* (ALEXOUPOULOS et al., 1996), que forma um complexo de fungos habitantes de solo, compostos por parótipos classificados em várias *formae speciales*, com base em critério patogênico. Cada grupo de *formae speciales* é patogênico a uma espécie ou a um grupo de plantas em particular, demonstrando o elevado grau de especificidade de hospedeiro (NELSON et al., 1983).

Dentre algumas doenças de importância econômica podem ser citadas: murcha-do-algodoeiro (*F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*), Fusariose do tomateiro (*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*), murcha-da-bananeira (*F. oxysporum* f. sp. *cubense*) e murcha-de-fusarium-do-feijoeiro (*F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*) (BEDENDO, 1995).

Das formas especializadas de *F. oxysporum*, uma das mais importantes em hortaliças no Brasil tem sido a espécie *Fusarium oxysporum* Schlechtend.:Fr. f. sp. *lycopersici* (Sacc.) W.C Snyder & H.N. Hansen, causadora da Fusariose do tomateiro (REIS; LOPES, 2007). O agente causal desta doença recebeu inicialmente a denominação *Fusarium oxysporum* Achal. subsp. *lycopersici* Sacc., 1886. Depois o denominaram *Fusarium lycopersici* Sacc. em 1935 e foi novamente classificado recebendo a denominação de *Fusarium bulbigenum* (Cke. e Mass.) Wr. e Reinking, em 1935. Finalmente, o nome do patógeno foi reclassificado e fixado como *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) W.C Snyder & H.N. Hansen, em 1940 (VALE et al., 2000).

A espécie *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* é agrupada em três raças fisiológicas (1, 2 e 3) conforme as suas habilidades de infectar e causar doença em uma série de cultivares possuidoras de genes em diferentes *loci* de resistência (BOHN; TUCKER, 1940). A Fusariose do tomateiro

em espécies do gênero *Solanum* está restrita às espécies *Solanum lycopersicon* L. e *Solanum pimpinellifolium* L., muito embora possa afetar outras solanáceas ornamentais malváceas e gramíneas (VALE et al., 2000).

O fungo *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* apresenta micélio septado, colônias pouco coloridas inicialmente, mas com a idade tornam-se amarelas, com aspecto pálido e, sob determinadas condições, adquire cor rosa pálida ou coloração purpúrea (VALE et al., 2000). Nesta espécie são produzidos dois tipos de esporos assexuais, os microconídios e macroconídios, além de estruturas de resistência denominadas clamidósporos (AGRIOS, 2005). Os microconídios são produzidos abundantemente em fiálides simples, apresentando formato oval a elipsóide, ligeiramente curvados e sem septos, medindo 5,5-14,5 μm x 2-3,5 μm (média 5,7 x 2,6 μm). Os macroconídios são esparsos a abundantes, produzidos em conidióforos ou na superfície de esporodóquios, apresentando formato fusóide e pontiagudos nas extremidades, com as paredes finas e três a cinco septos, medindo 23,5-36 μm x 3,5-5,5 μm (média 31,2 x 39 μm). Os clamidósporos apresentam paredes espessas, duplas e rugosas, formato globoso e podem ser formados isolados ou nas extremidades de conidióforos ou intercalados nas hifas ou nos macroconídios, constituindo as estruturas de resistência (NELSON et al., 1983; LESLIE; SUMMERELL, 2006). É comum aparecer macroconídios na superfície das plantas mortas pelo patógeno, formando agrupamentos semelhantes aos esporodóquios (AGRIOS, 2005).

Os clamidósporos de *F. oxysporum* podem ter uma ou duas células (KUROSAWA; PAVAN, 1997). Estes esporos são resultantes da transformação das hifas, medindo de 7-11 μm (VALE et al., 2000). Clamidósporos são considerados estruturas de resistência do patógeno e podem permanecer viáveis no solo na ausência do hospedeiro por anos. Reforçando a importância da adoção de medidas que impeçam a entrada do fungo em áreas onde ainda não foi constatada a patologia (COSTA et al., 2007).

Descrição da Doença: Fusariose do Tomateiro

A Fusariose do tomateiro é uma doença ocorre em todos os estados brasileiros, causando drástica redução na colheita, morte prematura das plantas ou destruição de todas as plantas (JULIATTI, 2001).

A primeira ocorrência de fusariose do tomateiro no Brasil foi em 1938, no município de Pesqueira, Sertão de Pernambuco (DESLANDES, 1940). Atualmente, encontra-se amplamente distribuída em todo o território nacional, provocando destruição quase total das plantas ou

reduzindo drasticamente o período de colheita e produtividade da lavoura, devido à queda prematura dos frutos e elevada mortalidade de plantas.

Este fungo é morfológicamente similar a outros membros da espécie *F. oxysporum*, mas separado por sua especialização fisiológica e patológica ao tomateiro (CORRELL, 1992; KATAN et al., 1994) e sobrevive entre as estações de cultivo do tomateiro, permanecendo dormente na forma de clamidósporos em tecidos deteriorados do hospedeiro e no solo (NELSON, 1981).

Os clamidósporos germinam sobre as raízes da planta e o tubo germinativo resultante deste processo penetra diretamente no interior da planta através de ferimentos. Após ocorrer a adesão de hifas nas células epidermais e corticais do hospedeiro, estas são penetradas por hifas constrictas que causam degradação local da parede celular (BECKMAN, 1987). A penetração ocorre mais frequentemente através das extremidades de raízes, onde aberturas naturais na parede celular ou ferimentos provocados pelo atrito das raízes com o solo provêm uma entrada para o tecido vascular em desenvolvimento (NELSON, 1981).

Após a penetração, as hifas crescem em direção aos vasos do xilema e passam a se desenvolver no seu interior, colonizando as células do feixe vascular, produzindo esporos e promovendo a distribuição sistêmica do fungo pela planta, através da corrente ascendente de seiva bruta. Com a evolução da colonização, ocorre o bloqueio dos vasos infectados, limitando parcial ou totalmente a passagem da água e elementos minerais para a parte aérea da planta (BECKMAN, 1987). O nível de extensão da colonização no hospedeiro por *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* determina o grau de expressão dos sintomas (GAO et al., 1995).

Os sintomas mais evidentes da doença são o amarelecimento das folhas, a partir das mais velhas, seguido de murcha da planta (LOPES; SANTOS, 1994). Externamente, os sintomas da Fusariose do tomateiro iniciam-se pelas folhas basais que perdem a turgidez, tornam-se amareladas, apresentam crestamento do limbo e, finalmente, caem. Quando se corta transversalmente a raiz ou o caule de uma planta doente, pode-se observar o típico escurecimento de vasos, que evidencia a presença do patógeno (NELSON, 1981).

O escurecimento dos feixes vasculares resulta da oxidação e polimerização de hidroxifenóis e ação da oxidase, embora as toxinas produzidas pelo fungo possam estar envolvidas indiretamente na exibição da murcha, tendo em vista servirem como incitadores de mecanismos de resistência do hospedeiro, tal como a deposição de géis e tiloses, que podem obstruir os vasos do xilema e contribuir para a síndrome da doença (BECKMAN, 1987).

Com a morte da planta, clamidósporos são produzidos e permanecem dormentes até que as condições sejam favoráveis ao seu desenvolvimento. Os clamidósporos podem ser

disseminados, na área de plantio, através do movimento de solo provocado por vento, água ou implementos. A disseminação local do patógeno também ocorre através da água de irrigação, mudas infectadas ou solo infestado da sementeira. A disseminação a longa distância ocorre através de mudas infectadas ou via sementes, no interior ou na superfície das mesmas (BECKMAN, 1987; JONES, 1991; KUROSAWA; PAVAN, 1997; AGRIOS, 2005).

Estratégias de Manejo de Doenças

As medidas preconizadas para o controle da Fusariose do tomateiro envolvem: a) uso de cultivares resistentes; b) manipulação da fertilidade do solo, como adicionar calcário para obter pH no mínimo 7,0; evitar o uso de micronutrientes; evitar o uso excessivo de fósforo e magnésio; usar nitrogênio na forma de nitrato, evitando a forma amoniacal; aplicar fertilizantes em faixas próximas às raízes e não diretamente na cova; c) impedir a drenagem de água de local infestado para novas áreas de plantio; d) permitir que o solo repouse antes do plantio; e) uso da rotação de culturas com plantas não hospedeiras por cinco a sete anos; f) prevenir a disseminação do patógeno eliminando o movimento de solo infestado, bem como o trânsito de máquinas, animais e operários de lavouras doentes para áreas livres da doença; g) eliminar os restos culturais diminuindo, assim, o inóculo inicial para o próximo ciclo da cultura (BECKMAN, 1987; JONES, 1991; LOPES; SANTOS, 1994).

O controle da maioria das doenças da cultura do tomateiro é feito através do uso indiscriminado de fungicidas, com aplicação de superdosagens e/ou números excessivos de aplicação, o que caracteriza riscos à saúde humana, principalmente quando há o desrespeito do período de carência, bem como riscos ao ambiente, caracterizados principalmente pelos longos períodos de persistência dos princípios ativos no ambiente, além de desequilíbrio ou desregulação de processos ecológicos essenciais para o funcionamento do agroecossistema. Segundo NAGARAJKUMAR et al. (2004), existe a necessidade de novas formas de controle, uma vez que o controle químico possui difícil execução e elevados custos, podendo resultar em contaminações do solo, bem como no surgimento de populações resistentes do patógeno.

Os problemas ambientais têm comprometido a produção de alimentos. Esta, por sua vez, tem sido apontada como um dos responsáveis por danos ao ambiente e à saúde humana em decorrência do uso indiscriminado de agroquímicos, que também possibilita aos patógenos adquirirem resistência a determinado produto. Os consumidores por sua vez fazem restrições aos alimentos produzidos com base nos agroquímicos.

Segundo COSTA e CAMPANHOLA (1997), a conservação do meio ambiente, além de ter um benefício social, tende a tornar-se um componente importante, gerando competitividade entre os produtos atualmente presentes no mercado. Isso tem levado a busca de alternativas sustentáveis, como a indução de resistência como medida de defesa vegetal à ocorrência de patógenos.

Indução de Resistência

A resistência do hospedeiro a uma doença pode ser definida, sob o aspecto fisiológico, como a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e/ou a subsequente atividade de um patógeno nos tecidos da mesma (AGRIOS, 2005).

As plantas são continuamente expostas a um grande número de patógenos, como resultado, apresentam um complexo mecanismo de defesa para reconhecer e se proteger, através do desenvolvimento de barreiras, como mecanismos de defesa pré e pós-formados que restringem a infecção/colonização. Em ambas as categorias, os fatores envolvidos na resistência podem ser subdivididos em estruturais ou bioquímicos. Os estruturais atuam como barreiras físicas, enquanto os bioquímicos atuam através da produção de substâncias tóxicas ou repelentes ao patógeno ou criando condições adversas ao estabelecimento deste na planta (SBALCHEIRO, 2006; MAZARO, 2007).

A indução de resistência é uma medida alternativa que pode ser utilizada no manejo integrado de doenças, principalmente naquelas onde o controle químico é ainda pouco efetivo (PASCHOLATI, 2003). Apesar da indução de resistência ser estudada desde o início do século XX (ARAÚJO et al., 2003), apenas recentemente suas potencialidades para o controle de doenças tem sido destacadas (GÖRLACH et al., 1996; CAVALCANTI et al., 2005).

Indutores podem ser usados para ativar mecanismos de defesa por meio de ação direta de moléculas elicitoras ou da indução da ativação de genes que codificam a síntese de fatores de resistência. Na indução da resistência, mecanismos latentes de defesa da planta são ativados por agentes indutores biológicos, físicos ou químicos (EL-GHAOUTH et al., 1998). Uma vez ativada, a resistência confere proteção inespecífica, caracterizada não somente pelos diferentes indutores que podem ser utilizados, como pelo amplo espectro de patógenos contra os quais a planta fica protegida (STICHER et al., 1997).

Quando o controle acontece por intermédio da indução de resistência, normalmente possui duas características altamente desejáveis: a amplitude da eficiência, que consiste na

proteção contra múltiplos patógenos; e a ação sistêmica, característica que confere defesa além da região de aplicação do indutor, a planta como um todo manifesta o estado indutivo.

Esse estado é denominado de “condicionamento” ou “sensibilização”, uma vez que a planta responde com mais eficiência e eficácia contra as tentativas de colonização pelo patógeno (STICHER et al., 1997). Quando a planta é induzida pela presença de um elicitor, são perceptíveis alterações em seu metabolismo. Porém, quando comparada à uma planta induzida com mesmo elicitor e posteriormente desafiada com o patógeno, nota-se que as alterações no metabolismo são mais intensas do que na planta apenas desafiada ou apenas induzida, evidenciando-se que a planta está mais capacitada para responder a presença do patógeno.

A presença do patógeno, após a indução, altera a expressão dos eventos bioquímicos, bem como, promove o acionamento de outros mecanismos, enquanto que plantas não induzidas e inoculadas com o patógeno apresentam menor magnitude desses eventos bioquímicos. Dessa forma, quando as plantas são pré-inoculadas com um microorganismo, embora pouco se observe em termos de alterações bioquímicas, a planta sistematicamente protegida reage de forma mais rápida e eficientemente ao desafio com um patógeno virulento (STICHER et al., 1997; HEIL; BOSTOCK, 2002).

Essas relações reforçam a complexidade envolvida na indução de resistência, com a ativação de vários processos, incluindo hipersensibilidade, barreiras estruturais, aumento da síntese de fitoalexinas e acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese (PRPs), como a hidrolase beta-1,3-glucanase, que degrada paredes celulares de patógenos fúngicos (HAMMERSCHMIDT, 1999). Esses sinais percorrem toda a planta, sistemicamente ou induzindo sua síntese em cadeia, num processo de autogenia. Genes de resistência, até o momento inativos, são ativados e se expressam para a síntese dos componentes de resistência (VAN LOON et al., 1998).

A reação de hipersensibilidade em plantas é considerada como um dos principais eventos da resposta de defesa da planta contra o ataque de patógenos, se caracterizando por ser uma resposta rápida e localizada, ou seja, que ocorre no sítio de infecção do patógeno.

Dentre as principais características da resposta estão o rápido e localizado colapso do tecido vegetal ao redor do sítio de infecção, ocasionado pela liberação de compostos tóxicos, os quais também atuam, em alguns casos, diretamente sobre o patógeno, ocasionando sua morte (AGRIOS, 2005). Ela envolve sucessivos eventos e sinais que compreendem desde o reconhecimento entre o patógeno e o hospedeiro até o colapso celular vegetal localizado. Caracterizando a primeira etapa da resposta de defesa da planta, sendo seguida de outras alterações, quer seja no sítio de infecção ou em toda a planta (VERBENE et al., 2000).

Assume-se que Resistência Sistêmica Adquirida (RSA/SAR - “Systemic Acquired Resistance”) envolve o acúmulo de PRPs como mecanismo de defesa da planta, sua indução é salicilato dependente, podendo resultar em alterações visuais (necroses, por exemplo) e geralmente é induzida por patógenos ou ativadores químicos. No caso da Resistência Sistêmica Induzida (RSI/ISR - “Induced Systemic Resistance”), não há acúmulo de PRPs, a planta que sofreu indução não exhibe alterações, o agente elicitor é usualmente um microrganismo não-patogênico e o fenômeno não é salicilato dependente, parecendo haver outra rota de sinalização associada a jasmonatos e etileno (ROMEIRO; GARCIA, 2009).

Em contraponto, trabalhos mais recentes afirmam que a utilização de microrganismos não patogênicos, como PGPR's pode aumentar a atividade de enzimas relacionadas à defesa de plantas, aumentando a expressão gênica (KIM et al., 2015; SHAHZAD et al., 2017)

Os genes de resistência estão associados com o aumento do ácido salicílico (AS), ácido jasmônico (AJ) e etileno (ET) (JALALI et al., 2006). A resistência sistêmica adquirida (RSA) está associada ao AS, o qual é o sinalizador para a expressão de certas proteínas relacionadas à patogenicidade (GRÜNER et al., 2003; GLAZEBROOK, 2005).

O principal papel fisiológico atribuído ao AS na planta é o de funcionar como uma molécula sinalizadora, induzindo-a a expressar resistência contra o ataque de predadores. Esta função foi sugerida em decorrência do AS se acumular em plantas submetidas a condições adversas, quer seja por ataque patogênico, quer pelo tratamento da planta com elicitores químicos, e por sua propriedade de induzir a expressão de genes ligados a várias PR-Proteínas (MARTINEZ et al., 2000).

O ácido jasmônico (AJ) e seus derivados (jasmonatos) estão relacionados a mecanismos de defesa vegetal. Eles induzem a expressão de genes que codificam proteínas específicas, como inibidores de proteases, enzimas envolvidas com a produção de flavonoides, bem como diferentes proteínas relacionadas com doenças (CORTÊS, 2000), desempenhando ainda papel importante na defesa das plantas contra danos causados por raios UV-B (SCHALLER, 2001).

Morfológica e fisiologicamente, os jasmonatos apresentam tanto efeito promotor como inibidor nos vegetais, sendo alguns destes efeitos semelhantes àqueles causados pelo ácido abscísico e pelo etileno. Existem estudos mostrando a ação dos jasmonatos sobre a senescência, acúmulo de proteínas de armazenamento, desenvolvimento de embriões e biossíntese de metabólitos secundários (CARLETTI et al., 1999).

O etileno está envolvido nos processos de resposta a estresses de caráter biótico ou abiótico como ataques de patógenos e injúrias nos tecidos vegetais e pode estar associado a

outros hormônios como auxina, AJ, AS. O etileno também pode ajudar a planta a distinguir um simbionte benéfico de um patogênico (LYNCH; BROW, 1997).

As alterações enzimáticas podem estar relacionadas aos aspectos fisiológicos combinados a indução de resistência da planta a doenças. Vários relatos demonstram a relação existente entre expressão da resistência sistêmica induzida e enzimas como peroxidase, polifenoloxidase, fenilalanina amônia-liase, β -1,3-glucanase e quitinase (VAN LOON et al., 1998).

Diversos agentes podem induzir a produção de sinais no vegetal, disparando reações que culminarão em proteção duradoura contra uma ampla gama de fitopatógenos (SOBRINHO et al., 2005). O composto sintético éster-S-metil do ácido benzo-(1,2,3)-tiadiazol-7-carbotióico (acibenzolar-S-metil, ASM, BTH, CGA 245704, Bion®, Actigard®), derivado do benzotiadiazol, é um análogo do ácido salicílico e tem sido amplamente estudado como agente indutor da RSA (TERRY; JOYCE, 2004).

A indução de resistência com a utilização de quitosana foi demonstrada em diversas culturas como o feijoeiro, em que o elicitor provocou o aumento na atividade de glucanase (DI PIERO; GARDA, 2008). Na avaliação do efeito da quitosana na indução de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, em plantas de caupi, verificou-se a redução da severidade da doença e o aumento da atividade da fenilalanina amônia-liase e β -1,3-glucanase (RODRIGUES et al., 2006). CAVALCANTI et al. (2006) avaliaram alguns indutores, entre eles a suspensão de quitosana proveniente de micélio de *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora, e obtiveram proteção em plantas de tomateiro atacadas por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

O tratamento de algumas plantas com extrato aquoso de nim proporcionou um controle de muitas doenças fúngicas através de alterações metabólicas em plantas, incluindo a indução de enzimas de biossíntese de fenol, enzima antioxidante defensiva e acúmulo de fenol, atividade de peroxidase, catalase e superóxido dismutase (GULERIA; KUMAR, 2006; ABOELLIL, 2007; FARAG HANAA et al., 2011).

O Biopiról é um fertilizante foliar e/ou radicular de alto desempenho à base de extrato pirolenhoso. A solução orgânica é originada da carbonização da madeira, que apresenta algumas semelhanças com os ácidos húmicos, por serem ambos derivados da transformação da lignina e de outros componentes de resíduos vegetais (COELHO et al., 2003). O produto, assim como o ASM, não apresenta efeito sobre o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (CRUZ et al., 2011).

Mecanismos Bioquímicos envolvidos na Indução de Resistência

O envolvimento de macromoléculas em interações patógeno-planta, do ponto de vista de resistência e de fisiologia do parasitismo, é conhecida há bastante tempo, seja como mecanismos pré-existentes (AGRIOS, 2005) seja como pós-formados (STICHER et al., 1997).

As plantas respondem ao ataque de patógenos ativando múltiplos mecanismos de defesa para proteger-se da infecção. Muitas vezes, essas rápidas respostas celulares são provocadas pelo reconhecimento de agentes patogênicos específicos (elicitors) e a ativação de caminhos de transdução altamente regulados. O objetivo principal desses caminhos é o núcleo da célula, onde os sinais levam à ativação de uma grande quantidade de genes de defesa (MALECK et al., 2000). Os produtos desses genes incluem proteínas relacionadas ao patógeno bem como enzimas implicadas na biossíntese de metabólitos protetores secundários.

A resistência sistêmica adquirida (RSA) envolve indução de mecanismos de defesa latentes que conferem proteção contra um amplo espectro de microrganismos (RYALS et al., 1996; DURRANG; DONG, 2004). Tal ativação pode ser obtida pelo tratamento da planta com agentes bióticos como uso de microrganismos viáveis ou atenuados (STANGARLIN; PASCHOLATI, 1994; SILVA et al., 2007; MACAGNAN et al., 2008; STADNIK; PAULERT, 2008; K.R.F. et al., 2012; STADNIK; FREITAS, 2012) ou com agentes abióticos como o ácido salicílico (HAMMERSCHMIDT; DANN, 1997), ácido aminobutírico (COHEN, 1996), ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA) (HIJWEGNWN et al., 1996) e acibenzolar-S-metil (ASM) (CAVALCANTI et al., 2006). Atualmente, outras substâncias como quitosana (RODRIGUES et al., 2006), fosfitos (LOPEZ; LUCAS, 2002; MELO et al., 2016), silicatos (DANTNOFF et al., 1992) e extratos vegetais (FELIPE; BACH, 2004; VIGO-SCHULTZ et al., 2006) têm sido testadas como indutores de resistência.

Segundo diversos autores, uma grande variedade de enzimas está relacionada com a resistência induzida, tais como peroxidases, polifenoloxidasas, fenilalanina amônia-liases, lipoxigenases, β -1,3-glucanases e quitinases. Assim, quando uma planta é levada ao estado de indução, a atividade dessas enzimas ou, pelo menos de algumas delas, tende a aumentar em relação às atividades em tecidos de plantas não expostas a elicitors (GLAZEBROOK, 2005; LEON-KLOOSTERZIEL et al., 2005; LOON et al., 2006)

Dependendo da planta e do agente de indução, essas substâncias acumulam-se tanto nos espaços intercelulares (quando teriam uma ação direta sobre o patógeno) como em vacúolos (quando teriam ação após eventos de patogênese que culminam com a descompartimentalização). Geralmente PRPs possuem potente atividade antimicrobiana “*in*

vitro” (ENKERLI et al., 1993; PONSTEIN et al., 1994; HU et al., 1997; STICHER et al., 1997) e é de se presumir que também possam controlar patógenos “*in vivo*” (VAN LOON, 1983; HERBERS et al., 1996; KLOEPPER, 1996). PRPs estimulam a liberação de elicitores de fitoalexinas (KUC, 1985; BOL et al., 1990; NEUENSCHWANDER et al., 1995) e induzem a síntese de compostos fenólicos (KEEN; YOSHIKAWA, 1983; KUROSAKI et al., 1986).

Quitinases e β -1,3-glucanases, por exemplo, degradam a parede celular de patógenos liberando moléculas que agem como elicitoras, nas etapas iniciais do processo de indução de resistência (VAN LOON et al., 1998; SOTOYAMA et al., 2016), dessa forma apresentam ação direta e imediata de defesa sobre o patógeno.

Polifenoloxidasas têm a propriedade de oxidar compostos fenólicos a quinonas, as quais geralmente são mais tóxicos aos microrganismos que os compostos fenólicos originais (STICHER et al., 1997). Estas enzimas permanecem de no espaço intracelular, compartimentalizadas dentro dos tilacóides nos cloroplastos, e em sua grande maioria em estado inativo (VAUGHN et al., 1988). Quando liberadas, iniciam o processo de oxidação de compostos fenólicos, que também são liberados dos vacúolos, produzindo quinonas, na medida em que ocorre a ruptura da célula, ocasionada por ferimentos, ação de insetos ou patógenos, ou ainda senescência (MACHEIX et al., 1986; CONSTABEL et al., 1995; MOHAMMADI; KAZEMI, 2002; THIPYAPONG et al., 2004) e também participam do processo de lignificação durante a invasão por patógenos (JUNG et al., 2004).

Peroxidasas têm afinidade por substratos envolvidos na lignificação celular e, além disso, seus produtos têm atividade antimicrobiana direta na presença de peróxido de hidrogênio (STICHER et al., 1997). Peroxidasas e polifenoloxidasas, dentre outras enzimas, estão relacionadas com ação antioxidante no combate de espécies reativas de oxigênio (ROS), cuja concentração normalmente aumenta em condições de estresse vegetal (MARTINS et al., 2018).

O papel destas enzimas no processo de defesa é reforçar a parede celular a partir da formação de lignina, suberina, polissacarídeos ferulicolados e glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (BOWLES, 1990), aumento na produção de espécies ativas de oxigênio que apresentam ação antimicrobiana, bem como atuam na sinalização (KAWANO; MUTO, 2000; RESENDE et al., 2003), incitando a formação de fitoalexinas (KRISTENSEN et al., 1999), participando também na peroxidação de lipídios que apresentam papel na sinalização, induzindo o acúmulo de AS (LÉON et al., 1995).

Promoção do crescimento vegetal por rizobactérias e o controle de fitopatógenos

Bactérias do gênero *Bacillus* pertencem ao grupo de microrganismos conhecidos como rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (do inglês *Plant growth-promoting rhizobacteria – PGPR*), são organismos de vida livre que estimulam direta ou indiretamente processos metabólicos e fisiológicos vegetais (PRATHAP; RANJITHA-KUMARI, 2014).

Há várias maneiras pelas quais bactérias promotoras de crescimento vegetal podem afetar diretamente o crescimento da planta: através da fixação de nitrogênio atmosférico, da solubilização de minerais, tais como fósforo, produção de sideróforos (moléculas que solubilizam e sequestram ferro), ou pela produção de reguladores de crescimento vegetal (hormônios), que acentuam o crescimento vegetal em vários estágios de desenvolvimento. A promoção indireta de crescimento ocorre quando a PGPR diminui ou impede os efeitos deletérios de um ou mais organismos fitopatogênicos (GLICK, 1995).

A promoção do crescimento radicular é um dos marcadores pelo qual o efeito benéfico das bactérias promotoras de crescimento é medido. O estabelecimento rápido de raízes por alongamento das raízes primárias ou por proliferação de raízes laterais e adventícias é vantajoso para plantas jovens. Com muitas raízes, essas plantas aumentam a sua habilidade de se ancorar ao solo e obter água e nutrientes do ambiente, acentuando, assim, as suas chances de sobrevivência (PAUL; LADE, 2014; PRATHAP; RANJITHA-KUMARI, 2014).

A microbiolização de sementes por bactérias é um processo que permite a colonização radicular, sendo de grande importância na introdução de agentes biocontroladores, permitindo que os mesmos estejam presentes ainda no processo germinativo, sendo essenciais para o estabelecimento e o desenvolvimento das comunidades microbianas associadas às raízes (HARTHMANN, 2009).

Muitas bactérias promotoras do crescimento sintetizam ácido indol-acético (AIA), e seu efeito na planta mimetiza o AIA exógeno (PATTEN; GLICK, 2002). O ácido indol-acético aparentemente não funciona como um hormônio em células bacterianas e sua produção pelas bactérias pode ter surgido devido à sua importância na relação bactéria-plantas. Este regulador, quando secretado por bactérias, poderia promover o crescimento da raiz diretamente pela estimulação do alongamento da célula vegetal ou divisão celular (PATTEN; GLICK, 2002). Segundo esses autores, o papel do AIA bacteriano na promoção do crescimento vegetal ainda não está totalmente esclarecido.

O modo de atuação das rizobactérias como promotoras de crescimento vegetal e biocontroladoras de fitopatógenos ocorre por diferentes mecanismos que operam em ação conjunta ou isoladamente (CORRÊA; BETTIOL, 2009), destacando-se os que agem diretamente no biocontrole e indiretamente na promoção de crescimento, como a produção de

enzimas que degradam as células da parede celular como quitinases e β -1,3-glucanases, enzimas que agem conforme a indução de resistência em resposta a um agente elicitor, como as peroxidases, produção de compostos que promovem a antibiose, como antibióticos e cianeto de hidrogênio (HCN), a colonização de raízes que é um importante processo que propicia a competição por nicho e o estabelecimento do biocontrolador nas fases iniciais do desenvolvimento vegetal, aumentando a densidade populacional do antagonista; a competição por nutrientes por meio da produção de quelatizantes de ferro denominados sideróforos; e os que agem diretamente na promoção de crescimento e indiretamente no biocontrole, com a solubilização de fosfato de cálcio, a fixação biológica de nitrogênio (FBN), a produção de ácido indol acético (AIA), dentre outros.

É provável que os hormônios de crescimento de origem microbiana possam provocar uma resposta fisiológica na planta hospedeira. Acredita-se que a produção de ácido indol-acético, giberelinas e outros reguladores de crescimento produzidos por PGPR auxiliem no aumento do comprimento das raízes, na área de superfície radicular e no número de pontas das raízes, aumentando a absorção de nutrientes e melhorando a saúde das plantas sob condições de estresse (EGAMBERDIEVA; KUCHAROVA, 2009)

A produção de ácido indol-acético é uma característica relativamente comum do PGPR, e acredita-se que essa bactéria neutralize o estresse de salinidade nas plantas. Mudanças morfológicas na raiz das plantas têm sido observadas repetidamente após a inoculação de *Azospirillum* e têm sido atribuídas à produção de substâncias promotoras de crescimento de plantas: auxinas, citocininas e giberelinas, sendo a produção de auxinas quantitativamente a mais importante (SPAEPEN et al., 2008).

PGPR podem também ser utilizadas no manejo integrado juntamente com fungicidas. LUZ (2003) verificou que o tratamento de sementes de trigo com diferentes combinações de *Paenibacillus macerans* Schardinger e difenoconazole, reduziram significativamente a incidência de *Fusarium graminearum* (Schwein.) Petch, *Bipolaris sorokiniana* Shoemaker, *Drechslera triticiprepentis* (Died.) Shoemaker e *Aspergillus* spp. nas sementes. Em campo todos os tratamentos promoveram aumentos significativos na germinação e no rendimento de grãos, com exceção do difenoconazole, que isoladamente, aumentou apenas o rendimento.

A aplicação de PGPR para o crescimento vegetal e defesa conta doenças combinam como estratégias de baixo custo para o aumento da eficiência produtiva. Essa estratégia já vem sendo testada por diversos trabalhos que concluem como positivo o saldo da promoção de crescimento aliado a defesa vegetal (AIMÉ et al., 2008; CRUZ et al., 2011; SOTOYAMA et al., 2016; BOUKERMA et al., 2017)

Esse efeito combinado de promoção de crescimento e controle de patologias aumenta a importância do estudo e utilização desses microrganismos como decisivos nas estratégias de manejo de culturas agrícolas.

REFERÊNCIAS

- ABOELLIL, A. H. Trilogy, a product of neem (*Azadirachta indica*) induces resistance in cucumber against *Podosphaera xanthi*. **Research Journal of Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 402-414, 2007.
- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5. ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. 922p.
- AIMÉ, S.; CORDIER, C.; ALABOUVETTE, C.; OLIVAIN, C. Comparative analysis of PR gene expression in tomato inoculated with virulent *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and the biocontrol strain *F. oxysporum* Fo47. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 73, p. 9-15, 2008.
- AKRAM, W.; ANJUM, T.; ALI, B. Searching ISR determinant/s from *Bacillus subtilis* IAGS174 against *Fusarium* wilt of tomato. **BioControl**, v. 60, n. 2, p. 271-280, April 01 2015. ISSN 1573-8248. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s10526-014-9636-1> >.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4 ed. New York: John Wiley & Sons Inc, 1996. 880p.
- ALVARENGA, M. A. R. Origem, botânica e descrição da planta. In: ALVARENGA, M. A. R. e AL., E. (Ed.). **Tomate: produção em campo, em casa-de-vegetação e em hidroponia**. Lavras: Editora UFLA, 2004. p.15-18.
- ANVISA. **Relatório de atividades de 2013 a 2015**. Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos – PARA Brasília, p.246. 2016
- ARAÚJO, J. S. P.; ROBBS, C. F.; RIBEIRO, R. L. D. Manejo integrado de fitobacterioses de importância econômica no Brasil. In: LUZ, W. C.; FERNANDES, J. M. C., *et al* (Ed.). **Revisão anual de patologia de plantas**, v.11, 2003. p.107-131.
- BECKMAN, C. H. **The nature of wilt diseases of plants**. St. Paul: APS Press, 1987. 175p.
- BEDENDO, I. P. Podridões de raiz e colo. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H., *et al* (Ed.). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.1, 1995. p.838-847.
- BOHN, G. W.; TUCKER, C. M. Studies on *Fusarium* wilt of the tomato: Immunity in *Lycopersicon pimpinellifolium* Mill. and its inheritance in hybrids. **Agricultural Experimental Station Research Bulletin**, Missouri, n. 311, p. 82, 1940.
- BOL, J. F.; LINTHORST, H. J. M.; CORNELISSEN, B. J. C. Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 28, p. 113-38, 1990.
- BOUKERMA, L.; BENCHABANE, M.; CHARIF, A.; KHÉLIFI, L. Activity of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) in the biocontrol of tomato fusarium wilt. **Plant Protection Science**, v. 53, n. 2, p. 78-84, 2017. ISSN 12122580.

BOWLES, D. J. Defense-related proteins in higher plants. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 59, p. 837-907, 1990.

CARLETTI, R.; MORAES, D. M.; VILLELA, F. A. Jasmonato: Influência na germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 21, p. 183-186, 1999.

CAVALCANTI, F. R.; RESENDE, M. L. V. D.; PEREIRA, R. B.; COSTA, J. D. C. D. B.; CARVALHO, C. P. D. S. Atividades de quitinase e beta-1,3-glucanase após eliciação das defesas do tomateiro contra a mancha-bacteriana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 1721-1730, 2006.

CAVALCANTI, L. S.; BRUNELLI, K. R.; STANGARLIN, J. R. Aspectos moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M. C., P., *et al* (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: Fealq, 2005. p.81-124.

CHITHRASHREE; UDAYASHANKAR, A. C.; CHANDRA NAYAKA, S.; REDDY, M. S.; SRINIVAS, C. Plant growth-promoting rhizobacteria mediate induced systemic resistance in rice against bacterial leaf blight caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Biological Control**, v. 59, n. 2, p. 114-122, 2011. ISSN 1049-9644. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964411001629> >.

CHOWDAPPA, P.; MOHAN KUMAR, S. P.; JYOTHI LAKSHMI, M.; UPRETI, K. K. Growth stimulation and induction of systemic resistance in tomato against early and late blight by *Bacillus subtilis* OTPB1 or *Trichoderma harzianum* OTPB3. **Biological Control**, v. 65, n. 1, p. 109-117, 2013/04/01/ 2013. ISSN 1049-9644. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964412002551> >.

COELHO, R. R. R.; BENITES, V. M.; BOM, E. P. S.; SACRAMENTO, D. R. **Avaliação do crescimento de actinomiceto em substratos contendo subprodutos da carbonização vegetal visando a produção de ácidos húmicos**. UFPR: Grupo Brasileiro da IHSS, 2003. 15p.p.

COHEN, L. Y. Induced resistance against fungal diseases by aminobutyric acids. In: LYR, H.; RUSSEL, P. E., *et al* (Ed.). **Modern Fungicides and antifungal compounds**. Andover: Intercept, 1996. p.461-466.

CONSTABEL, C. P.; BERGEY, D. R.; RYAN, C. A. Systemin activates synthesis of woundinducible tomato leaf polyphenol oxidase via the octadecanoide defense signaling pathway. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, Washington, v. 92, p. 407-411, 1995.

CORRÊA, E. B.; BETTIOL, W. Controle da podridão de raiz e promoção de crescimento em hidroponia com bactérias. In: BETTIOL, W. e MORANDI, M. A. B. (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p.224-237.

CORRELL, J. C. Genetic, biochemical, and molecular techniques for the identification and detection of soilborne plant-pathogenic fungi. In: SINGLETON, L. L.; MIHAIL, J. D., *et al*

(Ed.). **Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi**. St. Paul: APS Press, 1992. p.7-16.

CORTÊS, H. Introdução aos hormônios Vegetais. **Embrapa**, p. 131-157, 2000.

COSTA, H.; ZAMBOLIM, L.; VENTURA, J. A. Doenças de hortaliças que se Constituem em desafio para o controle. In: ZAMBOLIM, L. E. A. (Ed.). **Manejo integrado de doenças e pragas: hortaliças**. Viçosa: Editora UFV, 2007. p.319-336.

COSTA, M. B. B.; CAMPANHOLA, C. A. **Agricultura alternativa no Estado de São Paulo**. Embrapa - CNPMA, p.63. 1997. (Série Documentos, 7)

CRUZ, S. M. D. C.; RODRIGUES, A. A. C.; COELHO, R. S. B.; SARDINHA, D. H. S. Ação indutora de produtos abióticos na resistência de tomateiro e efeito sobre o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. **Idesia**, Chile, v. 29, n. 2, p. 111-118, 2011.

DANTNOFF, L. E.; SNYDER, G. H.; DEREN, C. W. Influence of silicon fertilizer grades on blast and brown spot development and on rice yields. **Plant Disease**, v. 76, p. 1182-1184, 1992.

DESLANDES, J. A. **Doenças do tomateiro no Nordeste**. Boletim da Sociedade Brasileira de Agronomia. Rio de Janeiro, p.442-453. 1940

DI PIERO, R. M.; GARDA, M. V. Quitosana reduz a severidade da antracnose e aumenta a atividade de glucanase em feijoeiro-comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 1121-1128, 2008.

DROBY, S.; WISNIEWSKI, M.; MACARISIN, D.; WILSON, C. Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? **Postharvest Biology and Technology**, v. 52, n. 2, p. 137-145, 2009/05/01/ 2009. ISSN 0925-5214. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092552140800327X> >.

DURRANG, W. E.; DONG, X. Systemic Acquired Resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 42, n. 185-209, 2004.

EGAMBERDIEVA, D.; KUCHAROVA, Z. **Selection for root colonising bacteria stimulating wheat growth in saline soils**. 2009. 563-571p.

EL-GHAOUTH, A.; WILSON, C. L.; WISNIEWSKI, M. Ultrastructural and cytochemical aspects of the biological control of *Botrytis cinerea* by *Candida saitoana* in apple fruit. **Phytopathology**, v. 88, p. 282-291, 1998.

ENKERLI, J.; GISI, U.; MOSINGER, E. Systemic acquired resistance to *Phytophthora infestans* in tomato and the role of pathogenesis related proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 43, p. 161-171, 1993.

FARAG HANAA, R. M.; ABDU, Z. A.; SALAMA, D. A.; IBRAHIM, M. A. R.; SROR, H. A. M. Effect of neem and willow aqueous extracts on fusarium wilt disease in tomato

seedlings: Induction of antioxidant defensive enzymes. **Annals of Agricultural Science**, v. 56, p. 1-7, 2011.

FELIPE, T. A.; BACH, E. E. **Extrato de manjeriço como indutor de resistência em plantas de cevada (variedade Embrapa 128) contra *Bipolaris sorokiniana***. Arquivos do Instituto Biológico, p.1-749. 2004

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo Manual de Olericultura: Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa: UFV, 2000. 421p.

GAO, H.; BECKMAN, C. H.; MUELLER, W. C. The rate of vascular colonization as a measure of the genotypic interaction between various cultivars of tomato and various formae or races of *Fusarium oxysporum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 46, p. 29-43, 1995.

GLAZEBROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 205-227, 2005.

GLICK, B. R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 109-117, 1995/02/01 1995. ISSN 0008-4166. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1139/m95-015> >. Acesso em: 2015/04/16.

GÖRLACH, J.; VOLRATH, S.; KNAUF-BEITER, G.; HENGY, G.; BECKHOVE, U.; KOGEL, K. H.; OOSTENDORP, M.; STAUB, T.; WARD, E.; KESSMANN, H.; RYALS, J. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. **The Plant Cell**, v. 8, p. 629-643, 1996.

GRÜNER, R.; G., S.; PFITZNER, A. P.; PFITZNER, U. M. Salicylic acid and the hypersensitive response initiate distinct signal transduction pathways in tobacco that converge on the as-1-like element of the PR-1a promoter. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 270, p. 4876-4886, 2003.

GULERIA, S.; KUMAR, A. Azadirachta indica leaf extract induces resistance in sesame against Alternaria leaf spot disease. **Journal of Cell and Molecular Biology**, v. 5, p. 81-86, 2006.

HAMMERSCHMIDT, D.; DANN, E. K. Induced resistance to disease. In: ECHCIGL, N. A. e REHCIGL, J. E. (Ed.). **Environmentally safe approaches to crop disease control**. Boca Raton: CRC – Lewis Publishers, 1997. p.177-99.

HAMMERSCHMIDT, R. Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? **Physiology and Molecular Plant Pathology**, v. 55, p. 77-84, 1999.

HARTHMANN, O. E. L. **Microbiolização de sementes com rizobactérias na produção de cebola**. 2009. 117p Doctoral Thesis (Doutorado em Produção Vegetal). setor de ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil.

HEIL, M.; BOSTOCK, M. R. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. **Annals of botany**, Londres, v. 89, p. 503-512, 2002.

HERBERS, K.; MEUWLY, P.; FROMMER, W. B.; METRAUX, J. P.; SONNEWALD, U. **Systemic acquired resistance mediated by the ectopic expression of invertase: possible hexose sensing in the secretory pathway.** 1996. p.

HIJWEGNWN, T.; VERHAAR, M. A.; ZADOKS, J. C. Resistance to *Sphaerotheca pannosa* in roses induced by 2,6-dichloroisonicotinic acid. **Plant Pathology**, v. 45, p. 632-635, 1996.

HU, X.; REDDY, A. S. N.; HU, X. Cloning and expression of a PR5-like protein from Arabidopsis: inhibition of fungal growth by bacterially expressed protein. **Plant Molecular Biology**, v. 34, p. 949-959, 1997.

IBGE. Tomate: Produtividade de 2015. 2015. Disponível em: < <http://www.sidra.ibge.gov.br>. >. Acesso em: 06 de agosto 2017.

JALALI, B. L.; S., B.; KAMBLE, A. Signal transduction and transcriptional regulation of plant defence responses. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 154, p. 65-74, 2006.

JONES, J. P. Fusarium wilt. In: JONES, J. B.; JONES, J. P., *et al* (Ed.). **Compendium of tomato disease**. St. Paul: APS Press, 1991. p.15.

JONES, J. P.; WOLTZ, S. S. Fusarium-incited diseases of tomato and potato and their control. In: PE, N.; TA, T., *et al* (Ed.). **Fusarium: Diseases, Biology, and Taxonomy**. Pennsylvania: Pennsylvania State University Press, 1981. p.157-168.

JULIATTI, F. C. Manejo integrado de fungos fitopatogênicos. In: SILVA, L. H. C. P.; CAMPOS, J. R., *et al* (Ed.). **Manejo Integrado: Doenças e Pragas em Hortaliças**. Lavras: UFLA, 2001. p.178.

JUNG, W. J.; JIN, Y. L.; KIM, Y. L.; KIM, Y. C.; KIM, K. Y.; PARK, R. D.; KIM, T. H. Inoculation of *Paenibacillus illinoisensis* alleviates root mortality, activates of lignification related enzymes, and induction of the isoenzymes in pepper plants infected by *Phytophthora capsici*. **Biological Control**, Orlando, v. 30, p. 645-652, 2004.

K.R.F., S.-E.; STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; BONALDO, S. M. Uso de Extratos Vegetais e Cogumelos na Indução de Resistência de PLantas a Patógenos. In: RODRIGUES, F. D. A.; FORTUNATO, A. A., *et al* (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos**. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora LTDA., 2012. p.9-28.

KATAN, T.; BERLINER, R.; KATAN, J. Vegetative compatibility in populations of *Fusarium oxysporum* from wild carnation. **Mycological Research**, Londres, v. 98, n. 12, p. 1415-1418, 1994.

KAWANO, T.; MUTO, S. Mechanism of Peroxidase actions for salicylic acid-nduced generation of active oxygen species and an increase in cytosolic calcium in tobacco cell suspension culture. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, p. 685-693, 2000.

KEEN, N. T.; YOSHIKAWA, M. 1,3-Endoglucanase from soybean releases elicitor-active carbohydrates from fungus cell walls. **Plant Physiol.**, v. 71, p. 460-465, 1983.

- KIM, J.-S.; LEE, J.; LEE, C.-H.; WOO, S. Y.; KANG, H.; SEO, S.-G.; KIM, S.-H. Activation of Pathogenesis-related Genes by the Rhizobacterium, *Bacillus* sp. JS, Which Induces Systemic Resistance in Tobacco Plants. **The Plant Pathology Journal**, v. 31, n. 2, p. 195-201, 2015. ISSN 1598-2254
2093-9280. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4454002/> >.
- KLOEPPER, J. W. Host specificity in microbe-microbe interactions. **BioScience**, v. 46, p. 406-409, 1996.
- KRISTENSEN, B. K.; BLOCH, H.; RASMUSSEN, S. K. Barley coleoptile peroxidases. Purification, molecular cloning and induction by pathogens. **Plant Physiology**, Rockville, v. 120, p. 501-512, 1999.
- KUC, J. Increasing crop productivity and value by increasing disease resistance through non-genetic techniques. Proceedings of a Symposium on Forest Potentials: Productivity and Value, 1985. Weyerhaeuser Co, Tacoma, Washington. p.147-190.
- KUĆ, J. Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. **European Journal of Plant Pathology**, v. 107, p. 7-12, 2001.
- KUMAR, N. V.; RAJAM, K. S.; RANI, M. E. Plant Growth Promotion Efficacy of Indole Acetic Acid (IAA) Produced by a Mangrove Associated Fungi-*Trichoderma viride*. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, n. 11, p. 2692-2701, 2017. ISSN 2319-7706. Disponível em: < <https://doi.org/10.7717/peerj.3107> >.
- KUROSAKI, F.; AMIN, M.; NISHI, A. Induction of phytoalexin production and accumulation of phenolic compounds in cultured carrot cells. **Physiologic Molecular Plant Pathology**, v. 28, p. 359-370, 1986.
- KUROSAWA, C.; PAVAN, M. A. Doenças do Tomateiro. In: KIMATI, H. A., L.; BERGAMIN FILHO, A., *et al* (Ed.). **Manual de Fitopatologia: Doenças de Plantas Cultivadas**. 3 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, 1997. p.690-719.
- LEON-KLOOSTERZIEL, K. M.; VERHAGEN, B. W. M.; KEURENTJES, J. J. B.; VANPELT, J. A.; REP, M.; VAN LOON, L. C.; PIETERSE, C. M. J. Colonization of the *Arabidopsis rhizosphere* by fluorescent *Pseudomonas* spp. activates a root-specific, ethylene-responsive PR-5 gene in the vascular bundle. **Plant Molecular Biology**, v. 57, p. 731-748, 2005.
- LÉON, J.; LAWTON, M. A.; RASKIN, I. Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. **Plant Physiology**, Rockville, v. 108, p. 1673-1678, 1995.
- LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The *Fusarium* laboratory manual**. Ames: Blackwell, 2006. 388p.
- LOON, L. C. V.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, n. 1, p. 135-162, 2006. Disponível em: < <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425> >.

LOPES, C. Introdução geral. In: LOPES, C. A. e ÁVILA, A. C. (Ed.). **Doenças do Tomateiro**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2005. p.11-15.

LOPES, C. A.; SANTOS, J. R. M. **Doenças do tomateiro**. Brasília: EMBRAPA-CNPB/SPI, 1994. p.

LOPEZ, A. M. Q.; LUCAS, J. A. Effects of plant defence activators on anthracnose disease of cashew. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, p. 409-420, 2002.

LUZ, W. C. D. Avaliação dos tratamentos biológico e químico na redução de patógenos em semente de trigo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 93-95, 2003. ISSN 0100-4158. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-41582003000100014&nrm=iso >.

LYNCH, J.; BROW, K. M. Ethylene and plant responses to nutritional stress. **Physiologia Plantarum**, v. 100, n. 3, p. 613-619, 1997.

MACAGNAN, D.; ROMEIRO, R. S.; BARACAT-PEREIRA, M. C.; LANNA-FILHO, R.; BATISTA, G. S.; POMELLA, A. W. V. Atividade de enzimas associadas ao estado de indução em mudas de cacauete expostas a dois actinomicetos residentes de filoplano. **Summa Phytopathologica**, v. 34, p. 34-37, 2008.

MACHEIX, J. J.; FLEURIET, A.; QUESSADA, M. P. Involvement of phenols and peroxidases in wound healing and grafting. In: GREPPIN, H.; PENEL, C., *et al* (Ed.). **Molecular and physiological aspects of plant peroxidases**. Geneva: University of Geneva, 1986. p.267-286.

MALECK, K.; LEVINE, A.; EULGEM, T.; MORGAN, A.; SCHMID, J.; LAWTON, K. A.; DANGL, J. L.; DIETRICH, R. A. The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. **Nature Genetics**, v. 26, p. 403–410, 2000.

MARTINEZ, C.; BACCOU, J.-C.; BRESSON, E.; BAISSAC, Y.; DANIEL, J.-F.; JALLOUL, A. D.; MONTILLET, J.-L.; GEIGER, J.-P.; ASSIGBETSÉ, K.; NICOLE, M. Salicylic acid mediated by the oxidative burst is a key molecule in local and systemic responses of cotton challenged by an avirulent race of *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 122, p. 757-766, 2000.

MARTINS, K.; DE BRITO, P. O. B.; DE ARRUDA, J. F.; NUNES JÚNIOR, F. H.; PONTES FILHO, R. A.; GONDIM, F. A. Plant Growth, Antioxidative Enzymes, Lipid Peroxidation and Organic Solute Contents in Mulungu Seedlings (*Erythrina velutina*) Under Different Field Capacities. **2018**, 2018-06-08, v. 10, n. 7, 2018-06-08 2018. ISSN 1916-9760. Disponível em: < <http://www.ccsenet.org/journal/index.php/jas/article/view/74579/41955> >.

MAZARO, S. M. **Indução de resistência à doenças em morangueiro pelo uso de elicitores**. 2007. 105p. Tese (Doutorado na área de Produção Vegetal). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil.

MELO, L. G. D. L.; SILVA, E. K. C. E.; CAMPOS-NETO, J. R. M.; LINS, S. R. D. O.; RODRIGUES, A. A. C.; OLIVEIR, S. M. A. D. Indutores de resistência abióticos no controle

da fusariose do abacaxi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 10, p. 1703-1709, 2016. ISSN 1678-3921.

MOHAMMADI, M.; KAZEMI, H. Changes in peroxidase and polyphenol oxidases activities in susceptible and resistance wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. **Plant Science**, Amsterdã, v. 162, p. 491-498, 2002.

NAGARAJKUMAR, M.; BHASKARAN, R.; VELAZHAHAN, R. Involvement of secondary metabolites and extracellular lytic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* in inhibition of *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen. **Microbiological Research**, v. 159, p. 73-81, 2004.

NELSON, P. E. Life cycle and epidemiology *Fusarium oxysporum*. In: MACE, M. E.; BELL, A. A., *et al* (Ed.). **Fungal wilt diseases of plants**. New York: Academic Press, 1981. p.51-80.

NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A.; MARASAS, W. F. O. **Fusarium species: an illustrated manual for identification**. University Park: The Pennsylvania State University Press, 1983. 193p.

NEUENSCHWANDER, U.; FRIEDRICH, L.; DELANEY, T.; VERNOOIJ, B.; KESSMANN, H.; RYALS, J. Activation of plant disease resistance. **Aspects of Applied Biology**, v. 42, p. 217-225, 1995.

PASCHOLATI, S. F. Indução de resistência sistêmica: opção para o controle de doenças de plantas no século XXI. **Summa Phytopathologica**, v. 29, p. 115-16, 2003.

PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. **Appl Environ Microbiol**, 2002/07/31, v. 68, n. 8, p. 3795-801, Aug 2002. ISSN 0099-2240 (Print) 0099-2240 (Linking).

PAUL, D.; LADE, H. Plant-growth-promoting rhizobacteria to improve crop growth in saline soils: a review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 34, n. 4, p. 737-752, October 01 2014. ISSN 1773-0155. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s13593-014-0233-6> >.

PERALTA, I. E.; SPOONER, D. M. Classification of wild tomatoes: a review. **Kurtziana**, Córdoba, v. 28, n. 1, p. 45-54, 2000.

PONSTEIN, A. S.; BRES VLOEMANS, S. A.; SELA BUURLAGE, M. B.; ELZEN, P. J. M. V. D.; MELCHERS, L. S.; CORNELISSEN, B. J. C.; VAN DEN ELZEN, P. J. M. A novel pathogen- and woundinducible tobacco (*Nicotiana tabacum*) protein with antifungal activity. **Plant Physiology**, v. 104, p. 109-118, 1994.

PRATHAP, M.; RANJITHA-KUMARI, B. D. A Critical Review on Plant Growth Promoting Rhizobacteria. **Journal of Plant Pathology & Microbiology**, v. 6, n. 4, 2014. ISSN 2157-7471.

REIS, A.; LOPES, C. A. Principais fungos de solo em hortaliças: epidemiologia e manejo. In: ZAMBOLIM, L. E. A. (Ed.). **Manejo integrado de doenças e pragas: hortaliças**. Viçosa: Editora UFV, 2007. p.189-191.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 2, p. 123-130, 2003.

RODRIGUES, A. A. C.; NETO, E. B.; COELHO, R. S. B. Indução de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *Tracheiphilum* em caupi: eficiência de indutores abióticos e atividade enzimática elicitada. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 492-499, 2006.

ROMEIRO, R. S.; GARCIA, F. A. O. Indução de Resistência em Plantas a Patógenos por Elicidores de Natureza Bacteriana. In: BETTIOL, W. (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Editora Embrapa Meio Ambiente, 2009. p.85-99.

RYALS, J. A.; NEUENSCHWANDER, U. H.; WILLITS, M. G.; MOLIN, A.; H.Y., S.; HUNT, M. D. Systemic acquired resistance. **Plant Cell**, v. 8, p. 1809-1819, 1996.

SBALCHEIRO, C. C. **Ação do biocontrolador com atividade de indução de resistência no controle do cretamento bacteriano comum do feijoeiro (*phaseolus vulgaris* L.)**. 2006. 124 Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, Brazil.

SCHALLER, F. Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid derived signaling molecules. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 11-23, 2001.

SHAHZAD, R.; KHAN, A. L.; BILAL, S.; ASAF, S.; LEE, I.-J. Plant growth-promoting endophytic bacteria versus pathogenic infections: an example of *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato. **PeerJ**, v. 5, p. e3107, 2017/03/16 2017. ISSN 2167-8359. Disponível em: < <https://doi.org/10.7717/peerj.3107> >.

SILVA, R. F.; S.F., P.; BEBENDO, I. P. Indução de Resistência em Tomateiro por Extratos Aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 3, p. 189-196, 2007.

SOBRINHO, C. A.; FERREIRA, P. T. O.; CAVALCANTI, L. S. Indutores Abióticos. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M., *et al* (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p.51-80.

SOTOYAMA, K.; AKUTSU, K.; NAKAJIMA, M. Biological control of *Fusarium* wilt by *Bacillus amyloliquefaciens* IUMC7 isolated from mushroom compost. **Journal of General Plant Pathology**, v. 82, n. 2, p. 105-109, March 01 2016. ISSN 1610-739X. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s10327-015-0641-8> >.

SPAEPEN, S.; DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; VANDERLEYDEN, J. Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. **Plant and Soil**, v. 312, n. 1, p. 15-23, November 01 2008. ISSN 1573-5036. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9560-1> >.

STADNIK, M. J.; FREITAS, M. B. Polissacarídeos Algais: Fonte de Indutores de Resistência de Plantas. In: RODRIGUES, F. D. A.; FORTUNATO, A. A., *et al* (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos**. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora LTDA., 2012. p.29-50.

STADNIK, M. J.; PAULERT, R. Uso de macroalgas marinhas na agricultura. XI Congresso Brasileiro de Ficologia/ Simpósio Latino-americano sobre algas nocivas., 2008. Rio de Janeiro RJ. Museu Nacional do Rio de Janeiro. p.267-279.

STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Proteção de plântulas de milho pipoca contra *Exserohilum turcicum* pelo uso de *Saccharomyces cerevisiae*. **Summa Phytopathologica**, v. 20, p. 16-21, 1994.

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

TERRY, L. A.; JOYCE, D. C. Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review. **Postharvest Biology and Technol.**, Amsterdam, v. 32, p. 1-13, 2004.

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

VAIKUNTAPU, P. R.; DUTTA, S.; SAMUDRALA, R. B.; RAO, V. R. V. N.; KALAM, S.; PODILE, A. R. Preferential Promotion of *Lycopersicon esculentum* (Tomato) Growth by Plant Growth Promoting Bacteria Associated with Tomato. **Indian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 4, p. 403-412, 2014. ISSN 0046-8991 0973-7715. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4186933/> >.

VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L.; PAUL, P. A.; COSTA, H. Doenças causadas por fungos em tomate. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R., *et al* (Ed.). **Controle de doenças de plantas: hortaliças**. Viçosa: Editora UFV, 2000. p.699-756.

VAN LOON, L.; BAKKER, P.; PIETERSE, C. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review Phytopathology**, v. 36, p. 453-483, 1998.

VAN LOON, L. C. The induction of pathogenesis-related proteins by pathogens and specific chemicals. **Neth. J. Plant Pathol.**, v. 89, p. 265-273, 1983.

VAUGHN, K. C.; LAX, A. R.; DUKE, S. O. Polyphenol oxidase: the chloroplast oxidase with no established function. **Physiologia Plantarum**, v. 72, p. 659-665, 1988.

VERBENE, M. C.; VERPOORTE, R.; BOL, J. F.; MERCADO-BLANCO, J.; LINTHORST, H. J. M. Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance. **Nature Biotechnology**, New York, v. 18, p. 779-783, 2000.

VIGO-SCHULTZ, S. C.; STANGARLIN, J. R.; FRANZENER, G.; PORTZ, R. L.; O.J., K.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Avaliação da eficácia da tintura etanólica de guaco (*Mikania*

glomerata) no controle da podridão negra (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) em couve-flor. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 27, p. 515-524, 2006.



CAPÍTULO 2

BACTERIAL FORMULATIONS IN INDUCTION OF RESISTANCE AND GROWTH PROMOTION OF TOMATO PLANTS



Bacterial Formulations in Induction of Resistance and Growth Promotion of Tomato Plants

José R. M. Campos Neto^{1,2}, Rafael Ribeiro Chaves², Diogo Herison Silva Sardinha^{1,2},
Luiz Gustavo de Lima Melo³ & Antônia Alice Costa Rodrigues²

¹ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão, Caxias, Maranhão, Brazil

² Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil

³ Verde Planta Ltda., São Luís, Maranhão, Brazil

Correspondence: José R. M. Campos Neto, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão, 65600-505, Caxias, Maranhão, Brazil. Tel: 55-98-991-050-418. E-mail: jose.campos@ifma.edu.br

Received: June 30, 2018

Accepted: July 31, 2018

Online Published: September 15, 2018

doi:10.5539/jas.v10n10p493

URL: <https://doi.org/10.5539/jas.v10n10p493>

The research is financed by Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Maranhão (FAPEMA).

Abstract

The objective of this work was to evaluate the effectiveness of seed treatment with fresh suspensions and powder formulations with *Bacillus methylotrophicus* to promote plant growth and induction of resistance against fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) in tomato plants under greenhouse conditions, verifying the occurrence of morphological and biochemical changes in the evaluated plants. Powder formulations based on Cassava (*Manihot esculenta*), Arrowroot (*Maranta arundinacea*) and sodium alginate containing *Bacillus*, in addition to the commercial product Quartz[®], were used to microbiolize the tomato seeds of the cultivar Santa Cruz. The formulations promoted plant growth, with a seedling vigor index greater than 50% for all treatments containing *B. methylotrophicus*, in addition to a significant increase in total dry matter. The treatments induced systemic resistance, controlling the fusarium wilt with a 75% reduction of the disease and activation of enzymes such as peroxidase and polyphenoloxidase, only β -1,3-glucanase presented less activity than controls (treatments without *B. methylotrophicus*). Thus, the use of formulations containing *Bacillus* are efficient in promoting plant growth of tomato plants and in inducing resistance to the control of fusarium wilt.

Keywords: *Bacillus methylotrophicus*, biological control, *Fusarium oxysporum*, plant growth-promoting bacteria, enzymatic activation

1. Introduction

The tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is important for the Brazilian economy (Carvalho, Kist, & Treichel, 2016), being the second most cultivated vegetable in the country (Camargo Filho & Oliveira 2012). The State of Maranhão is the sixth producing state in the Northeast, with just over 3,900 tonnes in 193 hectares of harvested area (IBGE, 2015).

Among the diseases that cause large losses in the tomato crop, we can highlight the fusarium wilt caused by the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Schlecht Snyder & Hansen (Inami et al., 2014). This disease occurs in all Brazilian states, significantly damaging the crop, with premature death of plants or destruction of all plants.

In addition, there is an urgent need for worldwide acceptance of the use of biological agents for disease control, partly in response to public concern about the use of toxic chemical pesticides, sometimes in violation of existing legislation, as noted in the ANVISA (2016), but also for the control of diseases that can not or are partially managed by other control strategies.

The use of resistance elicitors has been successful in the control of tomato fusarium wilt, including biotic and abiotic products, as well as the use of non-virulent *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* isolates (Frag Hanaa et al., 2011; Król, Igielski, Pollmann, & Kępczyńska, 2015; Szilagy-Zecchin, Mógor, Ruaro, & Röder, 2015).

Plants initiate response to primary and secondary metabolites of various associated plant pathogens. The immediate response of plants to various pathogenic attacks should be considered. (Mason et al., 2016). Among the secondary metabolites, plant hormones play a dynamic role in plant development and adaptation against biotic stresses. Salicylic acids (SA) and jasmonic acid (JA) are especially involved in the mediation of stresses in plants (Tsuda & Katagiri, 2010), as a defense against insects and diseases and plant regulation under limiting abiotic factors such as nutritional deficiency, drought and shading (Taiz, Zeiger, Møller, & Murphy, 2017).

As promising alternatives, plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) have been reported as host protectors against fungal infections (Droby, Wisniewski, Macarasin, & Wilson, 2009; Sotoyama, Akutsu, & Nakajima, 2016; Boukerma, Benchabane, Charif, & Khélifi, 2017). *Bacillus methylotrophicus* is a rhizosphere soil bacterium and considered a PGPR involved in phytostimulation and diseases suppression of agricultural crops (Chen et al., 2007; Jeukens et al., 2015). Further, it has been reported that PGPR can increase the activity of plant defense-related enzymes and increase gene expression (Kim et al., 2015; Shahzad et al., 2017). In addition, research also shows that PGPR has ample antifungal activity (Sotoyama et al., 2016).

Several bacteria in the genus of *Bacillus* are cited as plant growth promoters because they exert direct antibiotic action on several pathogens. Besides being relevant resistance inducing agents (Chithrashree et al., 2011; Paul & Lade, 2014; Szilagyi-Zecchin et al., 2015; Agbodjato et al., 2016; Sotoyama et al., 2016; Shahzad et al., 2017), they are promoting activation of genes for defense and expression of PR-proteins (Loon, Rep, & Pieterse, 2006; Solanki et al., 2012), such as β -1,3-glucanases, chitinases and peroxidases, which can act directly on the pathogen, or indirectly, by the induction of resistance in the host (Kim et al., 2015).

The objective of this study was to evaluate the efficacy of seed treatment with fresh suspensions and powder formulations of *Bacillus methylotrophicus* for promoting plant growth and induction of resistance against fusarium wilt (*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*) in plant tomato, under greenhouse conditions, and to verify if morphological and biochemical changes occurred in the plants evaluated.

2. Material and Methods

2.1 Experimental Location and Treatment Arrangement

The tests were performed at the Plant Pathology Laboratory and Greenhouse, located at the State University of Maranhão (UEMA) in Maranhão State, Brazil.

Powder formulations were prepared by aseptically mixing 400 mL of bacterial suspension (10^8 cfu/mL), with 1.0 kg of cassava powder (*Manihot esculenta* L.), arrowroot (*Maranta arundinacea* L.) and sodium alginate, separately. Two isolates of *Bacillus methylotrophicus*, B12 and B47, were used. The isolates are contributed by mycology collection “Dr. Gilson Soares da Silva” on MGSSB12 and MGSSB47 record. The powdered substrates were pre-sterilized in autoclave at 121 °C for 20 minutes. The formulations were used after 30 days of BOD storage at a temperature of 25 ± 2 °C and photoperiod of 12 hours under fluorescent white light.

The research considered as sources of variation: Suspensions of *Bacillus* B12 and B47 (SUS.B12 and SUS.B47), cassava powder + *Bacillus* B12 and B47 (MAN.B12 and MAN.B47), arrowroot powder + *Bacillus* B12 and B47 (ARA.B12 and ARA.B47), sodium alginate powder + *Bacillus* B12 and B47 (ALG.B12 and ALG.B47), QUARTZ® (fungicide based on *B. methylotrophicus*); besides control treatments constituted by the application of cassava powder + H₂O Distilled and Deionized-DD (MAN.CRT), arrowroot powder + H₂O DD (ARA.CRT), sodium alginate powder + H₂O DD (ALG.CRT) and just H₂O DD (CONTROL). In addition, the presence and absence of the pathogen were added as the second level of source of variation in the induced resistance for control of fusarium wilt.

Two parallel experiments were installed, one in tubes for evaluation of plant growth promotion and another in vessels for evaluation of induced resistance for control of fusarium wilt.

The seeds of the cultivar Santa Cruz were microbiolized with suspension of *B. methylotrophicus* by immersion of the seeds in the liquid suspensions and mixtures in the powder formulations in the proportion of 20 g/kg of seed. The microbiolized seeds were seeded in tubes for the growth promotion experiment and in trays for seedlings for the experiment of resistance induction and control of fusarium wilt.

2.2 Bacterial Formulations as Plant Growth Promoters

In the experiment to promote plant growth the seeds were sown and kept for 30 days in tubes with 6.5 cm of superior diameter, containing inert and sterile substrate (vermiculite), leaving one plant per tube. All plants were received two applications of foliar fertilization NPK 8-8-8 applied with costal sprayer to the point of leaf runoff.

The experiment was a completely randomized design, consisting of 13 treatments with four replicates, 100 plants for each replicate. The percentage of germination was evaluated 14 days after sowing, characterized as the portion of germinated seeds presenting its two cotyledons visible above the substrate.

Growth parameters were evaluated at 30 days of cultivation, including: root length, shoot length, root dry mass, and shoot dry mass. The vigor index of seedlings was obtained using the formula described by Abdul-Baki and Anderson (1973): $VI = \text{Length of seedlings (cm)} \times \text{germination percentage}$. The data were submitted to analysis of variance and their average compared by parametric statistical tests.

2.3 Bacterial Formulations as Inductors of Resistance

For the induced resistance experiment the seedlings were transplanted 15 days after sowing to 5.0 L pots containing autoclaved soil and bovine manure, in a ratio of 1:3, maintaining three plants pot⁻¹ corresponding to an experimental unit. The inoculation of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* occurred 30 days after sowing by depositing 60 mL of the inoculum suspension 1×10^6 conidia.mL⁻¹ in each pot. The pathogen comes from the mycology collection “Professor Gilson Soares da Silva”, on MGSS42 record.

The tomato plants were kept in a greenhouse until the end of the evaluations. The completely randomized design was used for the experiment resistance induced in disease control. A factorial arrangement was used: 13 (treatments) \times 2 (presence/absence of the pathogen) \times 04 replicates, each replicate represented by a pot containing three plants.

Leaf samples were collected 24, 48 and 240 hours after pathogen inoculation to evaluate the production of PR-proteins. The severity of the disease was evaluated at 21 days after inoculation using a rating scale: 1) Healthy plants; 2) Healthy plants, but with vascular necrosis; 3) Withered and chlorotic plants; 4) Withered plants with foliar necrosis; Necrotic or dead plants; these results expressed as percent disease control (Santos, 1999).

To determine the PR-proteins an enzymatic extract was prepared after the collection of the vegetal material.

Briefly, 1.0 g samples of leaves that corresponded to each treatment were macerated in a mortar with liquid nitrogen and 1% (v/v) polyvinylpyrrolidone (PVP), 5 mL of sodium acetate buffer (0.1 M, pH 5) and 1 mL of EDTA (1 mM). The extracts were centrifuged at 10,000 g for 10 minutes at 4 °C, and the supernatants were transferred to 2-mL *ependorf* tubes and stored at -80 °C. The enzyme extracts were used to determine the activities of peroxidases, polyphenol oxidases and β -1,3-glucanase.

The polyphenoloxidase activity-PPO (E.C. 1.10.3.1) was defined as the absorbance change at 410 nm and was calculated based on the molar extinction coefficient of 34 mM cm⁻¹ for catechol and expressed as $\mu\text{mol g}^{-1} \text{MF min}^{-1}$.

The peroxidase activity-POD (E.C. 1.11.1.7) was defined as the absorbance change at 470 nm and was calculated based on the molar extinction coefficient of 26.6 mM cm⁻¹ for guaiacol, and expressed as $\mu\text{mol g}^{-1} \text{MF min}^{-1}$.

The β -1,3-glucanase determination (E.C. 3.2.1.29) was performed by the glucose dosage released by laminarin hydrolysis (Somogyi, 1952), with results expressed as g Glucose g FM⁻¹ min⁻¹. The standard glucose curve was prepared in the same way as the samples, but laminarin was replaced with pre-established glucose concentrations (0 to 1,000 mg L⁻¹). Finally, data were submitted to analysis of variance and their means compared by mean tests.

3. Results

2.2 Bacterial Formulations as Plant Growth Promoters

All treatments containing *B. methylotrophicus* showed increased plant growth, especially the length of the root system, where all the treatments differed from the controls (Figure 1).

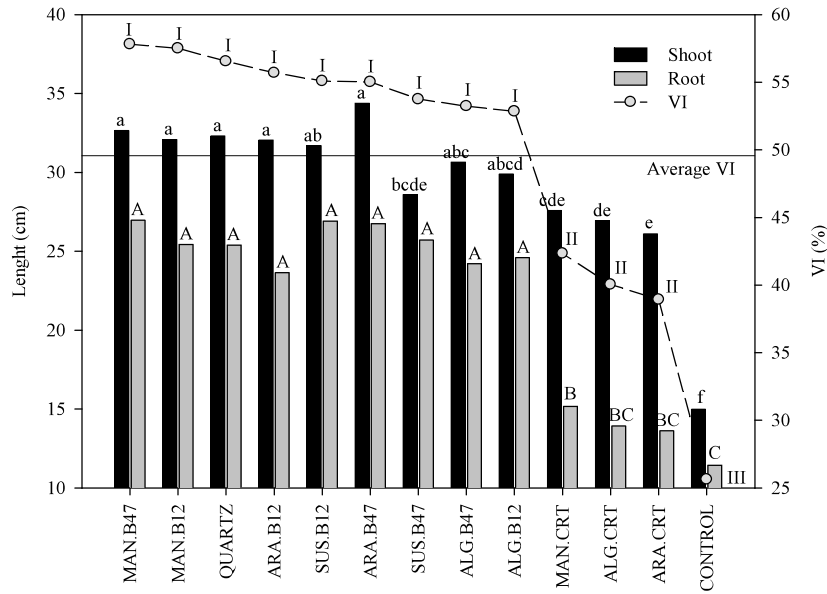


Figure 1. Shoot length and root system of tomato plants (cm). VI: Seedling vigor index. Equal letters do not differ from each other by the Tukey test ($p < 0.05$)

We highlight the formulations based on cassava and arrowroot containing the native isolates B12 and B47: the treatments promoted a significant increase in plant growth, resembling the commercial product Quartz®.

Treatments based on sodium alginate did not differ from controls over shoot length. It was observed that the alginate produced a thick mucilage around the seeds, which may have delayed the emergence and/or development of the aerial part for these treatments.

There was no significant difference between treatment for germination rate, all of which had average of 94% higher germination. All treatments containing *B. methylotrophicus* had a V.I. greater than 50%. Control treatments containing only the formulations of cassava powder, arrowroot and sodium alginate showed similar V.I.'s statistically to each other, whereas the control with water only had the lowest values for all growth parameters evaluated.

The values of dry matter corroborate the growth patterns presented previously (Figure 2). All treatments containing *B. methylotrophicus* showed significant root, shoot and total dry mass values when compared to the control treatments, with the exception of sodium alginate treatments and suspension treatment of *Bacillus* B47, which resembled some controls, even differing from the absolute control, which contained only water.

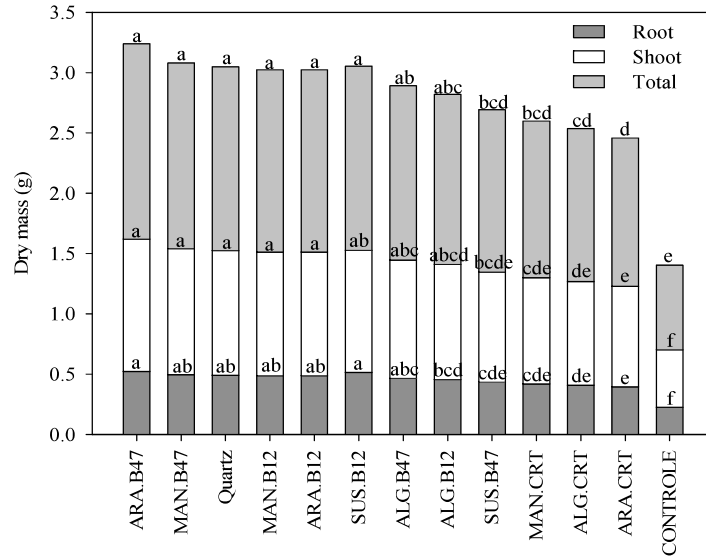


Figure 2. Root, shoot and total dry mass. Equal letters do not differ from each other by the Tukey test ($p < 0.05$)

2.3 Bacterial Formulations as Inductors of Resistance

Among the formulations tested, only Quartz[®] presented lower percentual control of fusarium wilt, controlling only 60% of the disease (Figure 3). The treatments containing *B. methylotrophicus* native from Maranhão presented a significant reduction in the disease, with absence of symptoms in the plants and inhibition of more than 70% of the disease, compared to the absolute control, which presented severe wilt associated with vascular dimming.

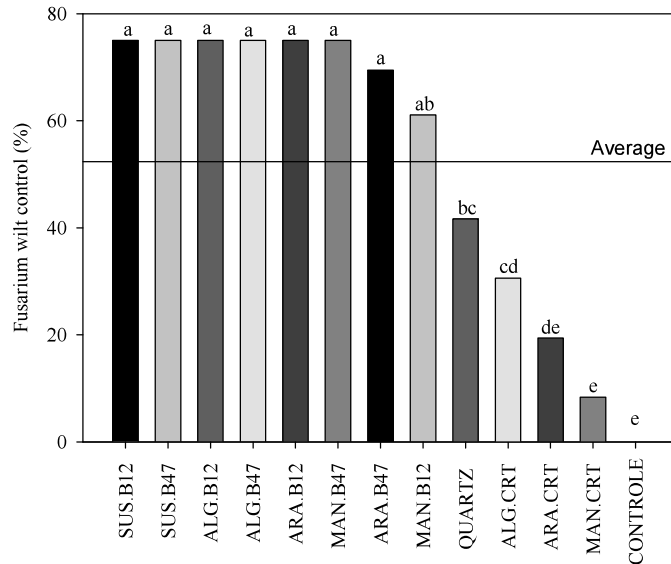


Figure 3. Control of fusarium wilt by application of formulations based on *Bacillus methylotrophicus*. Equal letters do not differ from each other by the Tukey test ($p < 0.05$)

We found a direct relationship between the action of the formulations tested on the expression of peroxidases and polyphenoloxidases activity and the disease control, indicating that these enzymes actively participated in the fight against the etiological agent fusarium wilt (Figure 4).

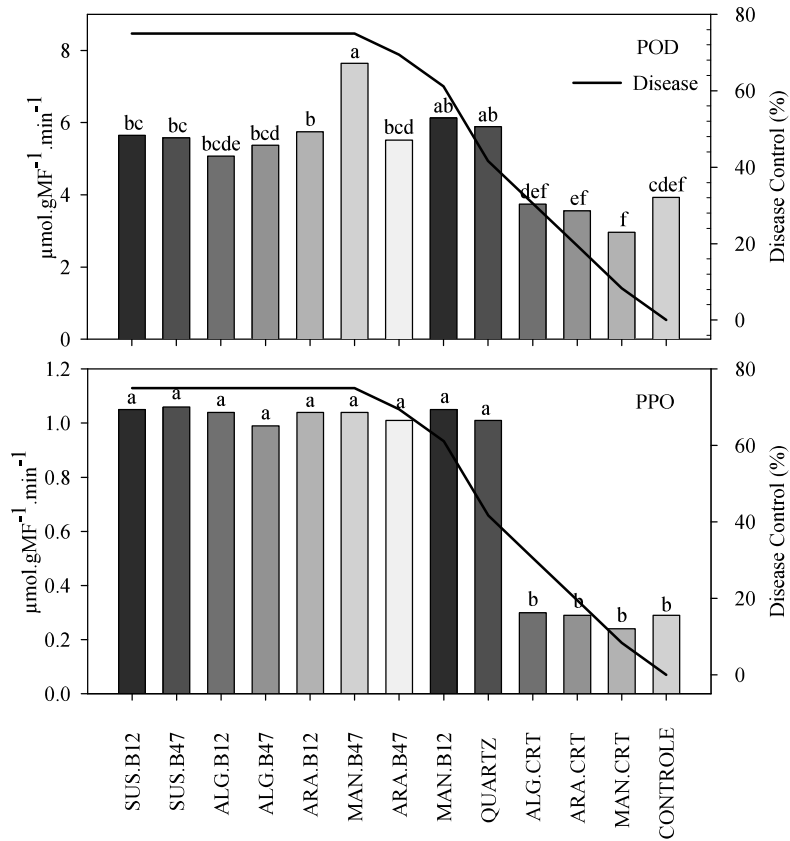


Figure 4. Effect of formulations on the activity of peroxides (POD) and polyphenoloxides (PPO), 240 hours after inoculation, in the control of fusarium wilt in tomato. Equal letters do not differ from each other by the Tukey test ($p < 0.05$)

The activities of peroxidase and polyphenoloxidase presented increasing values throughout the evaluations, differing significantly from the control treatments in each evaluation. The values of β -1,3-glucanase presented statistical difference, but only in the 240-hour sample, treatments ARA.B12 and ARA.B47 (arrowroot containing *B. methylotrophicus*) outperformed the control treatments (Figure 5).

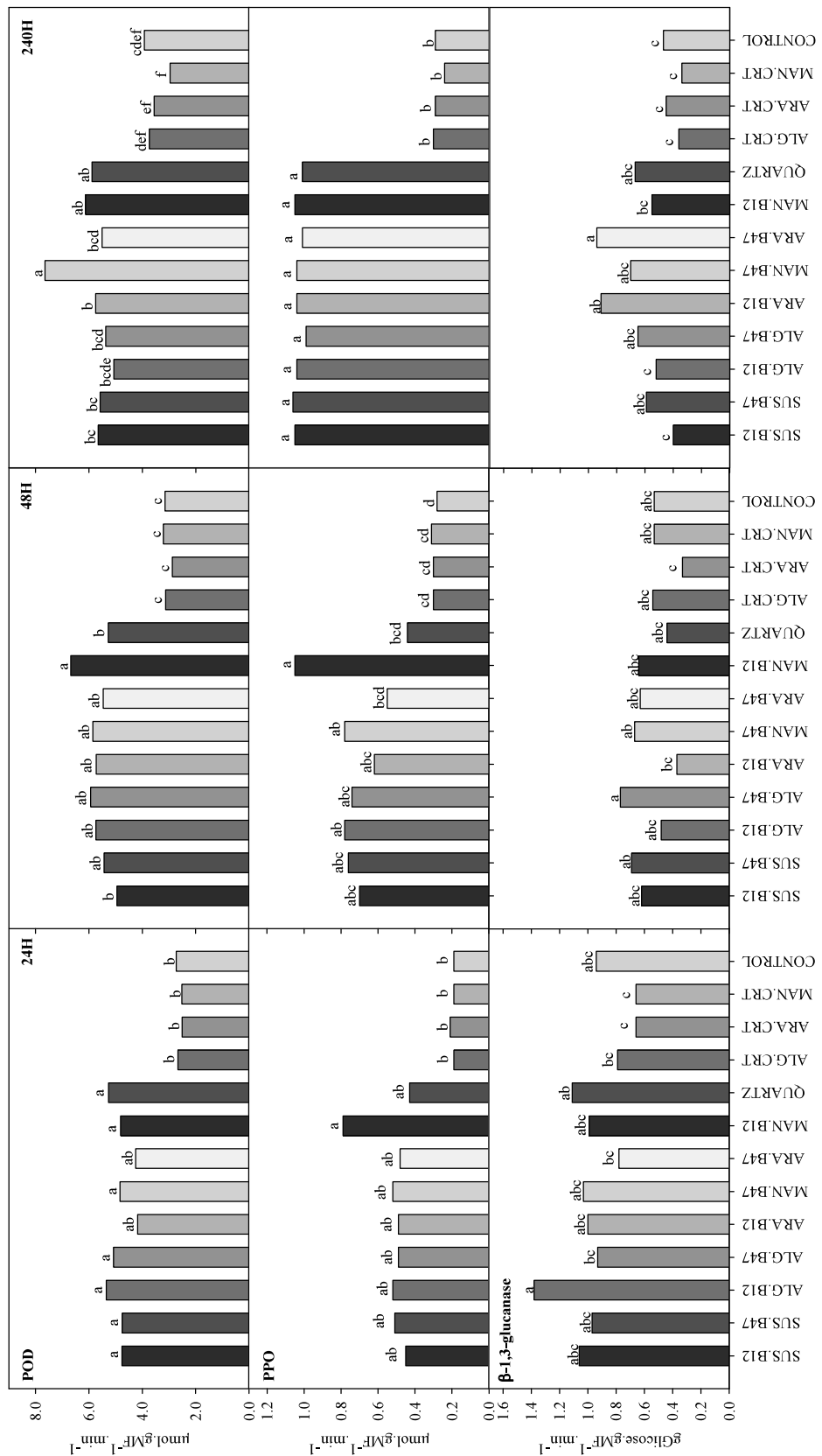


Figure 5. Activities of peroxidase (POD), polyphenoloxidase (PPO) and β -1,3-glucanase (β -1,3) enzymes in tomato plants 25, 48 and 240 hours after inoculation of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Equal letters do not differ from each other by the Tukey test ($p < 0.05$)

4. Discussion

To proceed, growth promoting ability in tomato plants under greenhouse conditions was observed through the propagation of the bacteria by formulations tested. We highlight all the morphological variables tested (plant height, root length, vigor index, root and shoot dry matter and total dry matter) stimulating greater growth in tomato plants. These results reinforce the biological potential of the isolates tested, as well as their adaptability when stored in formulations of low economic and environmental cost.

Chowdappa, Mohan Kumar, Jyothi Lakshmi, and Upreti (2013) found promising results on tomato seeds inoculated with *B. subtilis* and *Thichoderma harzianum* with significant increase in all seedling growth parameters. The authors described root length, aerial part length, leaf area, fresh weight of shoots and roots increased by 38.53%, 32.04%, 62.68%, 28.87% and 36.21%, respectively, in comparison with control seedlings.

It is clear that all treatments containing *Bacillus* promoted plant growth, especially the length of the root system, where all the treatments differed from the controls, indicating the potential this rhizobacterium in promoting good conditions for the development of the rhizosphere.

Formulations with combinations of beneficial bacterial strains that interact synergistically are in development and numerous research shows a promising trend in inoculation technology (Chithrashree et al., 2011; Sotoyama et al., 2016).

It is known that the materials used should not interfere with the bacterium-plant interaction to be considered minimally acceptable vehicles for agricultural practice, and also should provide ideal conditions for the proper development and storage of bacterial strains.

Furthermore, PGPR are excellent model systems that can provide biotechnology with new genetic constituents and bioactive chemicals with various uses in sustainable agriculture, providing control of diseases that can not or are partially managed by other control strategies.

Associated with an excellent germination rate for all seeds, the average Vigor Index value shows that all the plants treated with *B. methylotrophicus* had a rapid vegetative development, being superior to the control treatments (Tukey, $p < 0.05$), which gives them high survival capacity, vigor and stability of production.

The total accumulation of dry biomass promoted by native *B. methylotrophicus* treatments in cassava and arrowroot formulations represents a significant advance in the search for promising bioactive formulations, and linear data were found for size of plants (aerial part and root system) and vigor index value.

This notorious increase in plant growth coupled with biomass accumulation can be explained by the fact that several strains of *Bacillus* spp. and other PGPRs have the capacity to promote growth and increase in crop yield through increased absorption of nutrients stimulated by growth promotion factors such as expression of precursor genes of AIA and GA₃, and decrease of ethylene level due to root colonization (Chen et al., 2007). Furthermore, it is believed that these hormones stimulate further absorption of nutrients in the soil, translate signals between plant organs and integrate them to produce appropriate defense responses to biotic or abiotic stress (Ghanashyam & Jain, 2009).

These results were expected, since important metabolic changes were observed if we compared the significant differences between the activities of PR-proteins, confirming that there was activation of systemic resistance in the tomato cultivar Santa Cruz, with control of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* by the application of formulations based on *B. methylotrophicus*.

Similar results were obtained by Sotoyama et al. (2016), who verified the control of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* with the application of *B. amyloliquefaciens*, evaluated by the application of real time-PCR for relative expression of several PR-proteins, such as acid glucanase, basic glucanase, acid chitinase and basic chitinase.

In addition, Endophytic bacteria promote plant growth and regulation of defense hormones, and can be used in the ecological control of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* as suggested by Shahzad et al. (2017) when searching for *B. amyloliquefaciens* in tomato plants.

Araújo and Menezes (2009) observed a significant difference in the evaluation of peroxidase activity promoted by ASM, Azoxystrobin and *Bacillus subtilis* used as resistance elicitors in tomato plants. Similarly, Mandal, Mallick, and Mitra (2009) demonstrated that peroxidase activity showed a progressive increase in response to the application of salicylic acid, over 168 hours (7 days) in tomato plants.

It is known that high values of PR-proteins few hours after the pathogen application indicates that the plant activated or constituted sources of defense, a primordial characteristic of induced resistance described by several

authors as a state of alert, where the plant responds with greater agility and efficiency when establishing the challenging pathogen.

For several authors, the application of resistance elicitors promotes activation of Acquired Systemic Resistance (ASR), causing a marked reduction in symptoms of the disease once it occurs initially in the region of infection, seeking to prevent or delay the penetration of the pathogen (Mei et al., 2014; Kim et al., 2015).

The data corroborate with the results found by Akram, Anjum, and Ali (2015), who evaluated the application of *B. subtilis* against tomato fusarium wilt and determined the concentration of enzymes such as phenylalanine ammonia lyase, polyphenoloxidase and peroxidase, with a significant increase in PPO and POD activities.

In contrast, these results differ from those found by Solanki et al. (2012), who found gene expression and amplification of β -1,3-glucanase in plants treated with *Bacillus* spp. against *Rhizoctonia solani* in tomato.

5. Conclusions

This study demonstrated that fresh suspensions and powder formulations of cassava, arrowroot and alginate containing *B. methylophilicus* are efficient in promoting plant growth of tomato plants and resistance induced for the control of fusarium wilt under greenhouse conditions.

The seeds that are microbiolized with fresh suspensions and powdered formulations of cassava, arrowroot and alginate, containing *B. methylophilicus* present greater development of biomass area and root, reaching higher levels of seedlings vigor and consequently quality in tillage. Furthermore, the application of *B. methylophilicus* activates plant defense enzymes, increasing the activity of peroxidases and polyphenoloxidases in tomato plants, aid in the control of fusarium wilt, under greenhouse conditions, being equivalent to products already recommended, such as Quartz[®].

Acknowledgements

We thank the Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Maranhão (FAPEMA) for supporting this research.

References

- Abdul-Baki, A. A., & Anderson, J. D. (1973). Vigor Determination in Soybean Seed by Multiple Criterial. *Crop Science*, 13(6), 630-633. <https://doi.org/10.2135/cropsci1973.0011183X001300060013x>
- Agbodjato, N. A., Noumavo, P. A., Adjanooun, A., Agbessi, L., & Baba-Moussa, L. (2016). Synergistic Effects of Plant Growth Promoting Rhizobacteria and Chitosan on *In Vitro* Seeds Germination, Greenhouse Growth, and Nutrient Uptake of Maize (*Zea mays* L.). *Biotechnology Research International*, 2016, 7830182. <https://doi.org/10.1155/2016/7830182>
- Akram, W., Anjum, T., & Ali, B. (2015). Searching ISR determinant/s from *Bacillus subtilis* IAGS174 against fusarium wilt of tomato. *BioControl*, 60(2), 271-280. <https://doi.org/10.1007/s10526-014-9636-1>
- ANVISA. (2016). Activity Report 2013 to 2015. *Program for analysis of pesticide residues in food-PARA* (p. 246). Brasília: National Library.
- Araújo, F. F., & Menezes, D. (2009). Indução de resistência a doenças foliares em tomateiro por indutores biótico (*Bacillus subtilis*) e Abiótico (Acibenzolar-S-Metil). *Summa Phytopathologic*, 35(3), 169-172. <https://doi.org/10.1590/S0100-54052009000300001>
- Boukerma, L., Benchabane, M., Charif, A., & Khélifi, L. (2017). Activity of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) in the biocontrol of tomato fusarium wilt. *Plant Protection Science*, 53(2), 78-84. <https://doi.org/10.17221/178/2015-pps>
- Camargo Filho, W. P., & Oliveira, A. C. (2012). *Perfil da olericultura no Brasil e em São Paulo, 2011-junho/2012*.
- Carvalho, C. D., Kist, B. B., & Treichel, M. (2016). *Anuário brasileiro das hortaliças* (p. 64). Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz.
- Chen, X. H., Koumoutsis, A., Scholz, R., Eisenreich, A., Schneider, K., Heinemeyer, I., ... Borriss, R. (2007). Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nat Biotech*, 25(9), 1007-1014. <https://doi.org/10.1038/nbt1325>
- Chithrashree, Udayashankar, A. C., Chandra Nayaka, S., Reddy, M. S., & Srinivas, C. (2011). Plant growth-promoting rhizobacteria mediate induced systemic resistance in rice against bacterial leaf blight

- caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Biological Control*, 59(2), 114-122. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.06.010>
- Chowdappa, P., Mohan Kumar, S. P., Jyothi Lakshmi, M., & Upreti, K. K. (2013). Growth stimulation and induction of systemic resistance in tomato against early and late blight by *Bacillus subtilis* OTPB1 or *Trichoderma harzianum* OTPB3. *Biological Control*, 65(1), 109-117. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.11.009>
- Droby, S., Wisniewski, M., Macarasin, D., & Wilson, C. (2009). Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? *Postharvest Biology and Technology*, 52(2), 137-145. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.11.009>
- Farag Hanaa, R. M., Abdou, Z. A., Salama, D. A., Ibrahim, M. A. R., & Srour, H. A. M. (2011). Effect of neem and willow aqueous extracts on fusarium wilt disease in tomato seedlings: Induction of antioxidant defensive enzymes. *Annals of Agricultural Science*, 56, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.aos.2011.05.007>
- Ghanashyam, C., & Jain, M. (2009). Role of auxin-responsive genes in biotic stress responses. *Plant Signaling & Behavior*, 4(9), 846-848. <https://doi.org/10.4161/psb.4.9.9376>
- IBGE. (2015). *Tomato: Productivity 2015*. SIDRA.
- Inami, K., Kashiwa, T., Kawabe, M., Onokubo-Okabe, A., Ishikawa, N., Pérez, E. R., ... Arie, T. (2014). The Tomato Wilt Fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* shares Common Ancestors with Nonpathogenic *F. oxysporum* isolated from Wild Tomatoes in the Peruvian Andes. *Microbes and Environments*, 29(2), 200-210. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME13184>
- Jeukens, J., Kukavica-Ibrulj, I., Freschi, L., Jabaji, S., & Levesque, R. C. (2015). Draft Genome Sequences of Two Lipopeptide-Producing Strains of *Bacillus methylotrophicus*. *Genome Announcements*, 3(5). <https://doi.org/10.1128/genomeA.01176-15>
- Kim, J.-S., Lee, J., Lee, C.-H., Woo, S. Y., Kang, H., Seo, S.-G., & Kim, S.-H. (2015). Activation of Pathogenesis-related Genes by the *Rhizobacterium*, *Bacillus* sp. JS, Which Induces Systemic Resistance in Tobacco Plants. *The Plant Pathology Journal*, 31(2), 195-201. <https://doi.org/10.5423/ppj.nt.11.2014.0122>
- Król, P., Igielski, R., Pollmann, S., & Kępczyńska, E. (2015). Priming of seeds with methyl jasmonate induced resistance to hemi-biotroph *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* in tomato via 12-oxo-phytodienoic acid, salicylic acid, and flavonol accumulation. *Journal of Plant Physiology*, 179, 122-132. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.01.018>
- Loon, L. C. V., Rep, M., & Pieterse, C. M. J. (2006). Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annual Review of Phytopathology*, 44(1), 135-162. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425>
- Mandal, S., Mallick, N., & Mitra, A. (2009). Salicylic acid-induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47, 642-649. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.03.001>
- Mason, C. M., Bowsher, A. W., Crowell, B. L., Celay, R. M., Tsai, C.-J., & Donovan, L. A. (2016). Macroevolution of leaf defenses and secondary metabolites across the genus *Helianthus*. *New Phytologist*, 209(4), 1720-1733. <https://doi.org/10.1111/nph.13749>
- Mei, L., Liang, Y., Zhang, L., Wang, Y., & Guo, Y. (2014). Induced systemic resistance and growth promotion in tomato by an indole-3-acetic acid-producing strain of *Paenibacillus polymyxa*. *Annals of Applied Biology*, 165(2), 270-279. <https://doi.org/10.1111/aab.12135>
- Paul, D., & Lade, H. (2014). Plant-growth-promoting rhizobacteria to improve crop growth in saline soils: A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 34(4), 737-752. <https://doi.org/10.1007/s13593-014-0233-6>
- Santos, J. R. M. (1999). Protocolo de Tecnologia: Seleção para resistência a doenças em hortaliças. N.3 Tomateiro/Murcha-de-fusario. *EMBRAPA Hortaliças-Comunicado Técnico 11*. EMBRAPA Hortaliças.
- Shahzad, R., Khan, A. L., Bilal, S., Asaf, S., & Lee, I.-J. (2017). Plant growth-promoting endophytic bacteria versus pathogenic infections: An example of *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato. *PeerJ*, 5, e3107. <https://doi.org/10.7717/peerj.3107>
- Solanki, M. K., Robert, A. S., Singh, R. K., Kumar, S., Pandey, A. K., Srivastava, A. K., & Arora, D. K. (2012). Characterization of Mycolytic Enzymes of *Bacillus* Strains and Their Bio-Protection Role Against

- Rhizoctonia solani* in Tomato. *Current Microbiology*, 65(3), 330-336. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0160-1>
- Somogyi, M. (1952). Notes on sugar determination. *Journal of Biology and Biochemistry*, 195, 19-23.
- Sotoyama, K., Akutsu, K., & Nakajima, M. (2016). Biological control of fusarium wilt by *Bacillus amyloliquefaciens* IUMC7 isolated from mushroom compost. *Journal of General Plant Pathology*, 82(2), 105-109. <https://doi.org/10.1007/s10327-015-0641-8>
- Szilagyi-Zecchin, V. J., Mógor, Á. F., Ruaro, L., & Röder, C. (2015). Crescimento de mudas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) estimulado pela bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42 em cultura orgânica. *Revista de Ciências Agrárias*, 38, 26-33.
- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., & Murphy, A. (2017). *Fisiologia e desenvolvimento vegetal*. Porto Alegre: Artmed.
- Tsuda, K., & Katagiri, F. (2010). Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, 13(4), 459-465. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2010.04.006>

Copyrights

Copyright for this article is retained by the author (s), with first publication rights granted to the journal.

This is an open-access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



CAPÍTULO 3
INDOLE ACETIC ACID PRODUCTION AND GROWTH PROMOTION OF
TOMATO PLANTS BY BACTERIAL FORMULATIONS



Indole acetic acid production and growth promotion of tomato plants by bacterial formulations

José Ribamar Muniz Campos Neto^{1,2}; Antônia Alice Costa Rodrigues²
Rafael Ribeiro Chaves², Erlen Keila Candido e Silva², Anna Christina Sanazario de Oliveira; Diogo Herison
Silva Sardinha^{1,2}

¹ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão, Caxias, Maranhão, Brazil

² Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil

Corresponding authors: Antônia Alice Costa Rodrigues, Universidade Estadual do Maranhão, Laboratório de Fitopatologia, Caixa Postal 09, CEP 65054 970 São Luís, MA, Brasil E-mail: aacrodrigues@outlook.com

Received: Jun 30, 2018 Accepted: November XX, 201X Online Published: November XX, 201X

doi:10.5539/ URL: <https://doi.org/>

Indole acetic acid production and growth promotion of tomato plants by bacterial formulations

Abstract

The objective of this study was to evaluate the promotion of plant growth mediated by the application of fresh suspensions and powder formulations of *Bacillus methylotrophicus* under greenhouse conditions, verifying morphological changes and variation in indole-acetic acid content in the plants. Powder formulations based on Cassava (*Manihot esculenta* L.), arrowroot (*Maranta arundinacea* L.) and sodium alginate containing *B. methylotrophicus*, in addition to the commercial product Quartz[®], were used to microbiolize the tomato seeds of the cultivar Santa Cruz. The formulations promoted plant growth, with a seedling vigor index greater than 50% for all treatments containing *Bacillus*, in addition to a significant increase in total dry matter. The treatments promoted a significant increase in the contents of indole acetic acid in tomato plants, mainly in the aerial part of the plant. It is concluded that the use of formulations containing *B. methylotrophicus* are efficient in promoting plant growth of tomato plants, with an increase in the production of indole acetic acid in vegetable tissues. Remarkable increase was observed in shoot length (15.91%), shoot dry weight (52.92%) and root dry weight (31.4%), vigor index (18.75%) and concentration of indole-acetic acid (22.22%) content of tomato biomass over control. These results demonstrate that isolates B12 and B47 has the promising PGPR attributes to be developed as commercial formulations to enhance agrossystem ambiental health and promote tomato plant growth.

Keywords: *Bacillus methylotrophicus*, Morphological parameters, Phytohormone, PGPR, *Solanum lycopersicum* L.

Abbreviations: ALG.B12_sodium alginate powder + *B. methylotrophicus* B12; ALG.B47_sodium alginate powder + *B. methylotrophicus* B47; ARA.B12_arrowroot powder + *B. methylotrophicus* B12; ARA.B47_arrowroot powder + *B. methylotrophicus* B47; IAA_indole acetic acid; MAN.B12_cassava powder + *B. methylotrophicus* B12; MAN.B47_cassava powder + *B. methylotrophicus* B47; PBS 1X_Phosphate-saline buffer; PGPR_Plant Growth-Promoting Rhizobacteria; SH.DM_Shoot Dry mass; SH.L._Shoot Lenght; SUS.B12_ *B. methylotrophicus* B12 Suspension; SUS.B47_ *B. methylotrophicus* B47 Suspension;

RO.DM_Root Dry mass; RO.L._Root Length; RO.VOL._Root Volume; TO.DM_Total Dry mass; TO.L._Total Length; VI_Growth Vigor Index

Introduction

Agricultural systems have undergone changes in order to avoid soil degradation and promote the improvement of environmental quality. The biodiversity intensification in agricultural systems has been used to improve the production and sustainability of agroecosystems. In this context, the association of beneficial bacteria with agricultural crops has been described by several authors as a promising alternative for the promotion of plant growth, soil and resource management and environmental quality (Paul and Lade 2014; Szilagyi-Zecchin, Mógor et al. 2015; Agbodjato, Noumavo et al. 2016; Biasolo, Kucmanski et al. 2016; Gois de Oliveira, Nascimento et al. 2016; Kumar, Rajam et al. 2017).

Bacteria that associate with the plant by colonizing its roots are known as plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). In addition to colonizing the soil region under direct influence of the root system, some are also able to colonize the internal tissues of the plant species (Paul and Lade 2014; Prathap and Ranjitha-Kumari 2014).

The effect of promoting plant growth through PGPR, as bacteria of the genus *Bacillus*, results from the synergy of plant, environmental and microbiota factors, including the production of phytohormones such as indole acetic acid (IAA), emission of volatile compounds, secretion phytase activity under conditions of phosphate limitation, among others (Kamble and Galerao 2015; Preeti, Abhishek et al. 2015; Kumar, Rajam et al. 2017; Qiao, Yu et al. 2017; Raut, Shaikh et al. 2017; Martins, de Brito et al. 2018).

The phytohormone indole-acetic acid (IAA) is generally considered the most important native auxin, having the ability to regulate various aspects of plant growth and development (Zúñiga, Fuente et al. 2018), such as cell division, stretching, fruit development (Zhao 2010; Shao, Li et al. 2015; Biasolo, Kucmanski et al. 2016), aiding in the growth of the aerial part of the plant and its roots, mediating the vegetable tropism in response to light and gravity (Kelen, Çubuk Demiralay et al. 2004), as well as increasing the absorption of nutrients and water (Zhao 2010).

In order to validate sustainable alternatives to tomato production, the objective of this study was to evaluate the promotion of plant growth mediated by the application of fresh suspensions and powder formulations of *Bacillus methylotrophicus* under greenhouse conditions, verifying morphological changes and variation in indole-acetic acid content in the plants analyzed.

Results

Determination of morphological parameters

To proceed, the correlation matrix between the parameters of plant growth allowed comparing the data of the different variables (Table 1). It was verified slightly to the strong significant correlation between some parameters ($p < 0.05$). Noteworthy is the correlation values found between the length of the shoot and total plant length (Pearson > 0.83), as well as VI (Pearson $p > 0.81$). In the same way, the dry mass of the aerial part and root showed a strong correlation with the data of total dry matter (p of Pearson > 0.97), showing weak when comparing root length with root dry matter and total dry matter (p of Pearson > 0.33 and > 0.31 , respectively). The total length of the plant presented, even if significant, a negligible correlation with the total dry matter. In addition, the root volume variable did not correlate with any other analyzed.

All plant growth parameters evaluated showed a significant difference ($p < 0.05$) between the treatments, where the treatments that received application of formulations containing *B. methylotrophicus* exceeded the control treatment. For the shoot length, all treatments with native-Maranhao bacteria, especially those propagated in cassava or arrowroot substrates, with the exception of the MAN.B47 treatment, showed values higher than the control. Highlight for treatments ARA.B47, MAN.B12 and SUS.B12 that presented an average shoot growth 56% higher than control (Figure 1).

For the root growth parameter, the treatment MAN.B47 presented better performance, being 22% superior to the control treatment, but the other treatments based on cassava and arrowroot did not differ from the control in this parameter. The relative control based on the biological fungicide QUARTZ[®] showed the lowest averages of root growth, being inferior even to the absolute control, water.

In general, total plant growth - derived from the sum of root and shoot growth - was significant in treatments containing *B. methylotrophicus*, except for treatments MAN.B47 and QUARTZ[®], which were similar and inferior to control, respectively.

The results of dry matter of shoot, root and total had higher values than the control treatment, being highlighted the treatments based on isolates of *B. methylotrophicus* that presented values similar to QUARTZ treatment.

Regarding the root volume data, only the SUS.B12 treatment presented superiority to the control treatment, standing out among all treatments because it presented more than twice as much root as the control treatment.

For parameter VI, the treatments MAN.B47 and QUARTZ resembled the control treatment and all other treatments were superior to this one, standing out the treatment MAN.B12 that presented about 28% more growth than the treatment without *B. methylotrophicus*.

Analysis of indole-acetic acid production

There was significant interaction between the sources of variation treatments x portion evaluated for the indole-acetic acid content detected in plant tissues (Figure 2). In general, all the treatments presented about five times higher indole-acetic acid content in shoot in relation to root, being the treatment ARA.B47 which presented greater difference between the phytohormone contents.

The control treatment had higher indole acetic acid concentrations in the root system than treatments with *B. methylotrophicus* sources. With the exception of the treatments MAN.B47 and ARA.B47, the other treatments containing the bacteria had values about 70% lower than the control treatment.

In contrast, significant values of indole-acetic acid concentration were observed in the shoot of tomato plants treated with *B. methylotrophicus* isolates from Maranhao/Brazil propagated by cassava or arrowroot formulations, differing significantly from the control, except for plants treated with MAN.B47. We highlight the treatment ARA.B47 that obtained more than double the hormone content in the shoot of tomato plants when compared to the control treatment. The other treatments with formulations containing *B. methylotrophicus* resembled the ARA.B47 treatment, except for the ALG.B12 treatment, but none of them differed significantly from the control.

test ($p < 0.05$; $n = 50$; $CV = 15,30$)

Discussion

To proceed, Growth promoting ability in tomato plants under greenhouse conditions was observed through the propagation of the bacteria by formulations tested (Figure 1). We highlight all the morphological parameters tested (plant height, root length, vigor index, root and shoot dry matter and total dry matter) stimulating greater growth in tomato plants, except for the root volume.

The positive correlations between the parameters indicate that the plant development was mainly directed to the shoot growth and stabilization of the root system, represented by the strong correlations between shoot growth x total growth / vigor index and root dry matter x total dry matter, respectively.

It is evident that the treatments that received formulations containing *B. methylotrophicus* promoted a significant increase of the plant growth, mainly promoting a more vigorous shoot development, as well as accumulation of root-system dry matter, characterizing it as a well developed system to absorb water and nutrients for the nutritional crop balance.

The results corroborate those found by Vaikuntapu, Dutta et al. (2014) determined that the influence of application of the bacteria *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter* and *Aeromonas* in shoot growth, root, and plant dry weight. For the authors, the bacteria promoted a significant increase in these parameters mainly in tomato culture, when compared to others such as sorghum (*Sorgo bicolor* (L.) Moench), peanuts (*Arachis hypogaea* L.) and chickpeas (*Cicer arietinum* L.)

In addition, Preeti, Abhishek et al. (2015) also observed remarkable increases in seed germination (22.32%), shoot length (15.91%), root length (25.10%), shoot dry mass (52.92%), and root dry mass (31.4%), nitrogen (18.75%), potassium (57.69%) and phosphorus (22.22%) of shoot biomass over control in tomato plants stimulated by *Bacillus circulans*.

Qiao, Yu et al. (2017) demonstrate that the *B. subtilis* species colonizes the area around the primary tomato root, indicating the success of colonization as a key to the biocontrol of plant diseases and activities linked to the promotion of plant growth, besides positively impacting the composition of the microbiota of the rhizosphere.

Plant-growth promoting has great commercial importance for sustainable agriculture. Several authors claim that the genus *Bacillus* as preferred in the elaboration of biological formulations destined to phytopathogens control and vegetal growth (Borriss 2011; Chithrashree, Udayashankar et al. 2011; Chen, Chen et al. 2013; Prathap and Ranjitha-Kumari 2014).

In addition, results relating the effect of the formulations applied on tomato seeds and the increase of the indole-acetic acid content in the vegetable tissues demonstrate that the B12 and B47 isolates have promising PGPR attributes to be developed as formulations based on cassava and arrowroot for the promotion of plant growth.

Although it is known that all plant tissues can produce low auxins levels, apical meristems of the stem are the main centers of production of this hormone. Auxins may assume antagonistic effects, depending on their location; at the same time as they are responsible for the cellular expansion in the aerial part, can inhibit the expansion of the roots. (Taiz, Zeiger et al. 2017). This indication corroborates with the results of this study when comparing the different levels of indole-acetic acid in the plant tissues in relation to the morphological parameters of the

plants. There was clearly an increase in shoot growth over the root expansion of microbiolized tomato plants with *B. methylotrophicus*-containing formulations.

Kumar, Rajam et al. (2017) verified similar behavior in plants of *Vigna radiata* and *Vigna mungo*, occurring growth promotion in plants treated with IAA produced by *Trichoderma viride* VKF3. These authors describe a significant increase of shoot growth, however, there was no observation of major changes in root growth.

Moreover, the study is consistent with Harikrishnan, Vellasamy et al. (2014) who found a substantial increase in shoot length, total dry weight and vigor index of rice plants treated with IAA from *Streptomyces* sp VSMGT1014.

As contrast, the plants applied with B47 and those that did not receive any *Bacillus* source had the highest IAA content in roots. This fact may be related to a delay in the production of phytohormone by plants, corroborating with the results of vigor index, root volume, total length and total dry matter, where these plants obtained lower growth performance when compared to the other treatments.

Finally, the median performance presented by the treatments with sodium alginate can be explained since the product creates a viscous mucilage that hinders the application of the formulation and can also impede the contact of *Bacillus* with the root system of the plants.

Material and Methods

Experimental location and treatment arrangement

The tests were performed at the Plant Pathology Laboratory and Greenhouse, located at the State University of Maranhão - UEMA in Maranhão State, Brazil.

Powder formulations were prepared by aseptically mixing 400 mL of bacterial suspension (10^8 cfu/mL), with 1.0 kg of cassava powder (*Manihot esculenta* L.), arrowroot (*Maranta arundinacea* L.) and sodium alginate, separately. Two isolates of *Bacillus methylotrophicus* - B12 and B47 were used. The isolates are from mycology collection "Prof. Gilson Soares da Silva" on MGSSB12 and MGSSB47 record. The powdered substrates were pre-sterilized in autoclave at 121 ° C for 20 minutes. The formulations were used after 30 days of BOD storage at a temperature of 25 ± 2 °C and photoperiod of 12 hours under fluorescent white light.

The research considered as treatments: Suspensions of *B. methylotrophicus* B12 and B47 (SUS.B12 and SUS.B47), cassava powder + *B. methylotrophicus* B12 and B47 (MAN.B12 and MAN.B47), arrowroot powder + *B. methylotrophicus* B12 and B47 (ARA.B12 and ARA.B47), sodium alginate powder + *B. methylotrophicus* B12 and B47 (ALG.B12 and

ALG.B47), QUARTZ[®] (fungicide based on *B. methylotrophicus*); besides control treatment only with distilled and deionized water- H₂O.DD (CONTROL).

The seeds of the cultivar Santa Cruz were microbiolized with suspension of *B. methylotrophicus* by immersion of the seeds in the liquid suspensions and mixtures in the powder formulations in the proportion of 20 g/kg of seed. The microbiolized seeds were seeded in tubes for the growth promotion experiment.

The seeds were sown and kept for 30 days in tubes with 6.5 cm of superior diameter, containing inert and sterile substrate (vermiculite), leaving one plant per tube. All plants received two applications of 5 g of fertilization NPK 4-14-8 per tube applied on substrate.

Determination of morphological parameters

The percentage of germination was evaluated 14 days after sowing, characterized as the portion of germinated seeds presenting its two cotyledons visible above the substrate. Growth parameters were evaluated at 30 days of cultivation, including: a) root and shoot length, measured with millimeter ruler; b) total length obtained by the sum of the root and shoot length; c) root and shoot dry mass, expressed in grams, obtained in precision balance accurate to 0.001g. To determine the dry mass, the plant material was oven dried with forced air circulation at 65 °C until reaching constant weight; d) total dry mass in grams, obtained by the sum of the dry mass of shoots and roots; e) root volume, expressed in cm³, evaluated by the displacement of the water column in graduated cylinder. The roots were washed and placed in a beaker containing a known volume of water (100 mL) - by the difference, the direct response of the root volume was obtained by the equivalence of units (1 mL = 1 cm³), according to the methodology described by Scheffer-Basso (1999); f) The vigor index of seedlings – V.I., obtained using the formula described by Abdul-Baki and Anderson (1973): VI = Length of seedlings (cm) x germination percentage. The data were submitted to analysis of variance and their averages compared by parametric statistical tests.

Analysis of indole-acetic acid production

In addition, for the detection and quantification of IAA samples of shoots and roots were collected. 1 g of roots / shoot per treatment were macerated in liquid nitrogen, adding 6 mL of PBS 1X (pH = 7,2). The extracts were homogenized and centrifuged at 3000 g for 3 min at 4 °C. Then 0.5 ml of the supernatant was transferred jointly with 1 ml of Salkowski's Reagent (10mM FeCl₃, 34.3% perchloric acid) to a new tube, which was incubated in the dark at room temperature for 30 min, adapted from Gordon and Weber (1951). After the reaction, the

absorbance was measured at 520 nm, and all the tests were performed in triplicates. The quantitative determination of IAA was performed from the regression obtained with the standard curve (0 ng / L, 10 µg / L, 20 µg / L, 40 µg / L, 60 µg / L, 80 µg / L, 100 µg / L).

Statistical analyzes

The experiment was a completely randomized design, consisting of 10 treatments with four replicates of 50 plants. Data were submitted to analysis of variance and their means compared by mean tests. Pearson correlation analyzes were also performed to compare the independent data.

Conclusions

This study demonstrates the ability of formulations containing native *Bacillus methylotrophicus* from Maranhao/Brazil to promote plant growth of tomato plants, stimulating the increase of the concentration of indole-acetic acid in vegetable tissues. Powdered formulations of cassava and arrowroot containing *Bacillus methylotrophicus* B12 and B47 obtained satisfactory performance as products intended to promote plant growth. The application of the products promotes a significant increase in the content of indole-acetic acid in the tomato shoot, stimulating its growth and increase of the total dry matter of the tomato plant.

Acknowledgments

We thank the Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Maranhão (FAPEMA) for supporting this research.

References

- Abdul-Baki, A. A. and J. D. Anderson (1973). Vigor Determination in Soybean Seed by Multiple Criteria. *Crop Science* 13(6): 630-633.
- Agbodjato, N. A., P. A. Noumavo, et al. (2016). Synergistic Effects of Plant Growth Promoting Rhizobacteria and Chitosan on In Vitro Seeds Germination, Greenhouse Growth, and Nutrient Uptake of Maize (*Zea mays* L.). *Biotechnology Research International* 2016: 7830182.
- Biasolo, G. A. D., D. A. Kucmanski, et al. (2016). Isolation, Characterization and Selection of Bacteria that Promote Plant Growth in Grapevines (*Vitis* sp.). 2016 9(1).
- Borriss, R. (2011). Use of plant-associated *Bacillus* strains as biofertilizers and biocontrol agents. in *Bacteria in Agrobiolgy. Plant growth responses*. D. Maheshwari. Heidelberg, Springer.

- Chen, K.-N., C.-Y. Chen, et al. (2013). Formulation of a Novel Antagonistic Bacterium Based Biopesticide for Fungal Disease Control Using Microencapsulation Techniques. 2013 5(3).
- Chithrashree, A. C. Udayashankar, et al. (2011). Plant growth-promoting rhizobacteria mediate induced systemic resistance in rice against bacterial leaf blight caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Biological Control* 59(2): 114-122.
- Gois de Oliveira, L. d. J. M., I. d. O. Nascimento, et al. (2016). Desempenho de variedades melhoradas e cablocas de arroz (*Oryza sativa* L.) em condições ambientais da baixada maranhense. *Cadernos de Agroecologia* 10(3).
- Gordon, S. A. and R. P. Weber (1951). COLORIMETRIC ESTIMATION OF INDOLEACETIC ACID. *Plant Physiology* 26(1): 192-195.
- Harikrishnan, H., S. Vellasamy, et al. (2014). Optimization for production of Indole acetic acid (IAA) by plant growth promoting *Streptomyces* sp VSMGT1014 isolated from rice rhizosphere.
- Kamble, K. D. and D. K. Galerao (2015). Indole acetic acid production from *Pseudomonas* species isolated from rhizosphere of garden plants in Amravati. *IJAPBC* 4.
- Kelen, M., E. Çubuk Demiralay, et al. (2004). Separation of Abscisic Acid, Indole-3-Acetic Acid, Gibberellic Acid in 99 R (*Vitis berlandieri* x *Vitis rupestris*) and Rose Oil (*Rosa damascena* Mill.) by Reversed Phase Liquid Chromatography.
- Kumar, N. V., K. S. Rajam, et al. (2017). Plant Growth Promotion Efficacy of Indole Acetic Acid (IAA) Produced by a Mangrove Associated Fungi-*Trichoderma viride*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6(11): 2692-2701.
- Martins, K., P. O. B. de Brito, et al. (2018). Plant Growth, Antioxidative Enzymes, Lipid Peroxidation and Organic Solute Contents in Mulungu Seedlings (*Erythrina velutina*) Under Different Field Capacities. 2018 10(7).
- Paul, D. and H. Lade (2014). Plant-growth-promoting rhizobacteria to improve crop growth in saline soils: a review. *Agronomy for Sustainable Development* 34(4): 737-752.
- Prathap, M. and B. D. Ranjitha-Kumari (2014). A Critical Review on Plant Growth Promoting Rhizobacteria. *Journal of Plant Pathology & Microbiology* 6(4).
- Preeti, M., W. Abhishek, et al. (2015). Efficiency of plant growth-promoting P-solubilizing *Bacillus circulans* CB7 for enhancement of tomato growth under net house conditions. *Journal of Basic Microbiology* 55(1): 33-44.
- Qiao, J., X. Yu, et al. (2017). Addition of plant-growth-promoting *Bacillus subtilis* PTS-394 on tomato rhizosphere has no durable impact on composition of root microbiome. *BMC Microbiology* 17(1): 131.
- Raut, V., I. Shaikh, et al. (2017). Plant growth promotion using microbial IAA producers in conjunction with azolla: a novel approach. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 4(1): 1.
- Scheffer-Basso, S. M. (1999). Caracterização morfológica e fixação biológica de nitrogênio de espécies de *Adesmia* DC e *Lotus* L, UFRGS.
- Shao, J., S. Li, et al. (2015). Analysis and cloning of the synthetic pathway of the phytohormone indole-3-acetic acid in the plant-beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. *Microbial Cell Factories* 14: 130.
- Szilagyi-Zecchin, V. J., Á. F. Mógor, et al. (2015). Crescimento de mudas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) estimulado pela bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42 em cultura orgânica. *Revista de Ciências Agrárias* 38: 26-33.
- Taiz, L., E. Zeiger, et al. (2017). *Fisiologia e desenvolvimento vegetal*. Porto Alegre, Artmed.

- Vaikuntapu, P. R., S. Dutta, et al. (2014). Preferential Promotion of *Lycopersicon esculentum* (Tomato) Growth by Plant Growth Promoting Bacteria Associated with Tomato. *Indian Journal of Microbiology* 54(4): 403-412.
- Zhao, Y. (2010). Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annu Rev Plant Biol* 61: 49-64.
- Zúñiga, A., F. d. l. Fuente, et al. (2018). An Engineered Device for Indoleacetic Acid Production under Quorum Sensing Signals Enables *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134 To Stimulate Plant Growth. *ACS Synthetic Biology* 7(6): 1519-1527.

Table 1: Correlation matrix between morphological parameters of tomato plants

	SH.L.	RO.L.	RO.VOL.	TO.L.	VI	SH.DM	RO.DM	TO.DM
SH.L.	1							
RO.L.	0,01	1						
RO.VOL.	0,04	0,04	1					
TO.L.	0,84*	0,55*	0,06	1				
VI	0,82*	0,45*	0,01	0,94*	1			
SH.DM	-0,08	0,31*	0,02	0,10*	0,04	1		
RO.DM	-0,07	0,33*	0,09	0,12*	0,03	0,97*	1	
TO.DM	-0,08	0,31*	0,05	0,11*	0,04	0,98*	0,98*	1

*Correlations highlighted in bold are statistically significant ($p < 0.05$). SH.L. = Shoot Length; RO.L. = Root Length; RO.VOL. = Root Volume; TO.L. = Total Length; VI = Growth Vigor Index; SH.DM = Shoot Dry mass; RO.DM = Root Dry mass; TO.DM = Total Dry mass

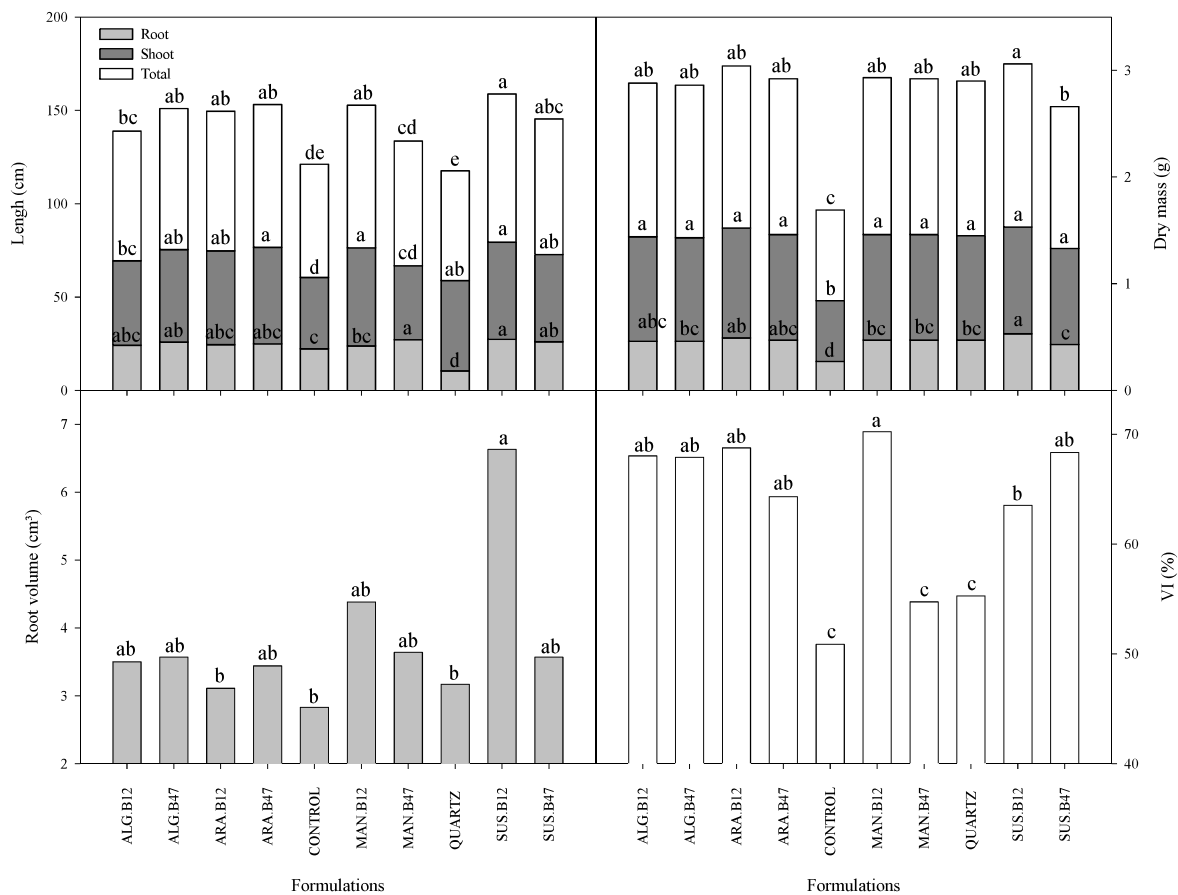


Figure 1: Growth parameters of tomato plants 30-day after sowing. Averages followed by the same letter in parameter do not differ in a Tukey's test ($p < 0.05$; $n = 446$). Shoot Length: CV = 19,83; Root Length: CV = 21,15; Total Length: CV = 15,10; Shoot dry mass: CV = 21,30; Root dry mass: CV = 20,71; Total dry mass: CV = 20,92; Root volume: CV = 49,37; VI: CV = 15,15.

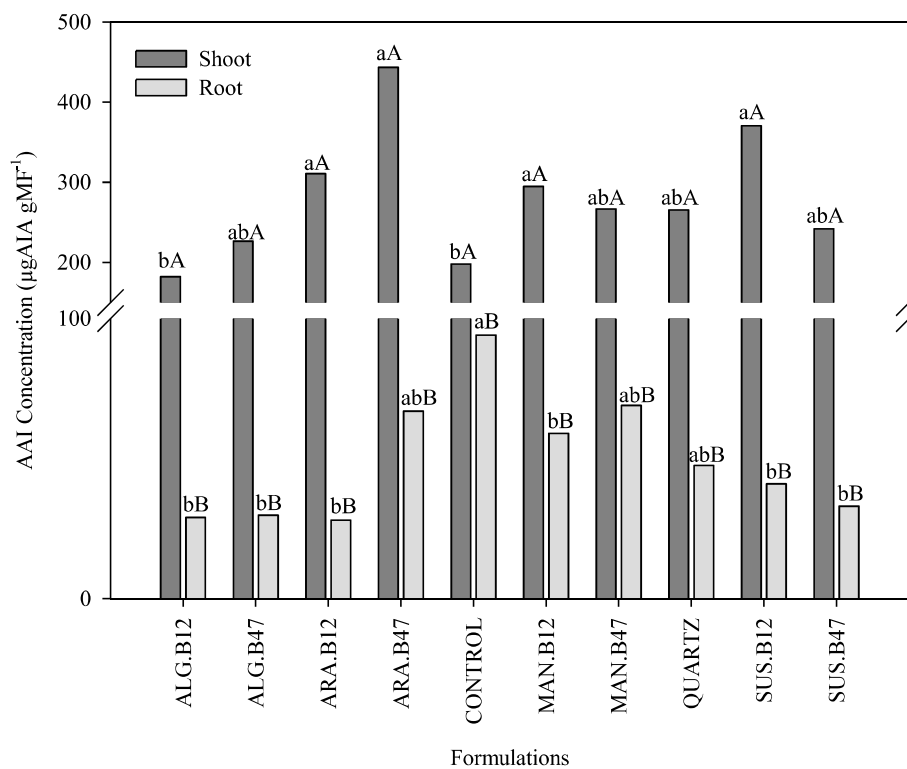


Figure 2: indole acetic acid production per gram fresh matter of tomato plant tissue 30-day after sowing. Averages followed by the same letter, capital letters between plant tissues and lowercase letters between treatments, do not differ in the Tukey's test ($p < 0.05$)



CAPÍTULO 4
RELATÓRIO DESCRITIVO DE PATENTE DE INVENÇÃO: COMPOSIÇÃO
DE BIOFERTILIZANTE PARA A PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E
AUMENTO DE PRODUTIVIDADE DE OLERÍCOLAS

Relatório descritivo de patente de invenção: Composição de biofertilizante para a promoção de crescimento e aumento de produtividade de olerícolas

José Ribamar Muniz Campos Neto⁽¹⁾ e Antônia Alice Costa Rodrigues⁽¹⁾

⁽¹⁾Universidade Estadual do Maranhão, Laboratório de Fitopatologia, Caixa Postal 09, CEP 65054-970 São Luís, MA, Brasil. E-mail: munizneto@msn.com, aacrodriues@outlook.com

Autor para correspondência: José Ribamar Muniz Campos Neto e-mail: munizneto@msn.com

Campos Neto JRM, Rodrigues AAC, (2018). Relatório descritivo de patente de invenção: Composição de biofertilizante para a promoção de crescimento e aumento de produtividade de olerícolas.

RELATÓRIO DESCRITIVO DE PATENTE DE INVENCÃO

COMPOSIÇÃO DE BIOFERTILIZANTE PARA A PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E CONTROLE DE FITOPATÓGENOS EM OLERÍCOLAS

Campo da Invenção

A presente invenção se situa no campo da agricultura com ênfase no manejo das interações microbianas solo-cultura. Mais especificamente, a presente invenção proporciona composição de biofertilizantes que favoreçam a promoção de crescimento e aumento de produtividade de olerícolas além de auxiliarem na defesa vegetal contra agentes patogênicos. Os biofertilizantes da invenção compreendem as linhagens de *Bacillus methylotrophicus* provenientes da coleção de microrganismos do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, sobre registro MGSS B12 e MGSS B47.

Sumário da Invenção

Em um aspecto, a presente invenção proporciona um processo de promoção de crescimento e aumento de produtividade de olerícolas, além da imunização destas contra agentes patogênicos, compreendendo a inoculação das mesmas com linhagens de *Bacillus methylotrophicus* provenientes da coleção de microrganismos do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, sobre registro MGSS B12 e MGSS.

São dadas, portanto, com ênfase na promoção de crescimento e aumento de produtividade de olerícolas, as referidas etapas:

a) Isolar linhagens bacterianas associadas a lavouras de distintas localidades do Estado do Maranhão.

b) Caracterizar diferentes habilidades promotoras de crescimento vegetal entre as bactérias isoladas a fim de que possam ser selecionadas com potencial para a produção de biofertilizante.

c) Selecionar isolados com potencial de promoção de crescimento de plantas de forma quantitativa (nº de características) e qualitativa (diferentes graus de atividade).

d) Selecionar substâncias com potencial de veiculação das células bacterianas, determinando a qualidade da colonização do material pelas células bacterianas.

e) Contatar o referido isolado bacteriano selecionado com a planta de interesse, através da inoculação das sementes.

f) Determinar a capacidade de promoção de crescimento e o aumento da produtividade de plantas, através de experimentos em câmara de crescimento e em experimento de campo.

g) Determinar a capacidade de indução de resistência do tomateiro, através da quantificação de enzimas envolvidas no processo de redução da severidade da doença ou indução de resistência sistêmica adquirida em plantas de tomate.

Em uma realização preferencial, o melhoramento da presente invenção compreende a modulação da fixação de nitrogênio e/ou de fatores promotores de crescimento.

É outro objeto da presente invenção, composições para biofertilizante agrícola compreendendo:

- a) O material biológico de linhagens selecionadas.
- b) Veículo aceitável e adequado para a prática agrícola.

Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

Descrição Detalhada da Invenção

Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo sem limitar o escopo da mesma.

Composição de biofertilizante para a promoção de crescimento de plantas e Controle de Fitopatógenos

O método envolvendo biofertilizante que favorece a promoção de crescimento e o controle de fitopatógenos em olerícolas compreende as seguintes etapas:

Linhagens de Bacillus

As linhagens de *Bacillus methylotrophicus* MGSS B12 e MGSS B47 da presente invenção foram isoladas durante análise de material vegetal de cultivares de arroz de diferentes

regiões, através do emprego de metodologias que favorecem o isolamento de bactérias endofíticas.

Material Biológico

O material biológico útil na presente invenção inclui, mas não se limita aos elementos como DNA, RNAs e/ou proteínas, inteiros ou parciais, isolados de de *Bacillus methylotrophicus* MGSS B12 e MGSS B47.

Material Biológico Vegetal

O material biológico útil na presente invenção inclui, mas não se limita aos elementos como DNA, RNAs e/ou proteínas, inteiros ou parciais, células, órgãos, tecidos vegetais, incluindo plantas e/ou sementes em formação ou completamente formadas.

Células trabalhadas

As células trabalhadas da presente invenção compreendem pelo menos um material biológico de linhagens escolhidas que compreende *Bacillus methylotrophicus* MGSS B12 e MGSS B47.

Formulações

As formulações da presente invenção compreendem:

- a) O material biológico de linhagens selecionadas.
- b) Veículo aceitável e adequado para a prática agrícola.

Veículo aceitável e adequado para a prática agrícola

O veículo aceitável da presente invenção pode ser escolhido do grupo que compreende excipientes e carreadores aceitáveis para a prática agrícola, doses e tratamentos convenientes para uso em composições particulares que podem ser descritas em uma série de regimes.

Exemplo 1. Obtenção e caracterização das bactérias promotoras de crescimento vegetal

Teste de eficiência de formulações para veiculação de *Bacillus methylotrophicus*.

Foram preparadas formulações em pó misturando-se assepticamente 400 mL de suspensão bacteriana com 10^8 ufc/mL, com 1,0 kg de pó de mandioca (*Manihot esculenta* L.), araruta (*Maranta arundinacea* L.) e alginato de sódio, separadamente. Foram utilizados dois isolados de *Bacillus methylotrophicus* - MGSS B12 e MGSS B47, provenientes da coleção de microrganismos do Laboratório de Fitopatologia da UEMA, sobre registro MGSS B12 e MGSS B47. Os substratos em pó foram previamente esterilizados em autoclave a 121 °C, durante 20 minutos. As formulações foram utilizadas após 30 dias de armazenamento em BOD em temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas sob luz branca fluorescente.

O material foi acondicionado em temperatura ambiente e testado a viabilidade das células bacterianas ao longo do tempo, através do reisolamento em meio de cultura BDA e quantificação por contagem indireta de células bacterianas através de método adaptado de LUDWIG et al. (2004), que consistiu da adição de 25 ml de solução salina (NaCl 0,85 %) a cada parcela experimental, sendo a concentração definida por espectrofotometria a 540 nm.

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado e consistiram na avaliação da viabilidade das células bacterianas nos períodos de 03, 05, 10, 30, 45, 60, 90 e 120 dias após o preparo das formulações com as féculas, cada um com cinco repetições.

Experimentos de promoção de crescimento de arroz em casa de vegetação

As sementes de tomate cv. Santa Cruz foram microbiolizadas com suspensão de *B. methylotrophicus* pela imersão das sementes nas suspensões líquidas e misturadas nas formulações em pó na proporção de 20 g/kg de semente.

As sementes foram semeadas e mantidas por 30 dias em tubetes de 6,5 cm de diâmetro superior contendo substrato inerte e estéril (vermiculita), deixando-se uma planta por tubete. Todas as plantas receberam duas aplicações de adubação foliar NPK 8-8-8 aplicado com pulverizador costal até o ponto de escoamento foliar.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, consistindo de 13 tratamentos com quatro repetições de 100 plantas. Foi realizada avaliação da percentagem de

germinação 14 dias após a semeadura, caracterizada como a porção de sementes germinadas apresentando seus dois cotilédones visíveis acima do substrato.

Avaliou-se parâmetros de crescimento aos 30 dias de cultivo, incluindo: comprimento de raiz, comprimento de parte aérea, massa seca de raiz, massa seca de parte aérea. O índice de vigor de plântulas foi obtido usando a fórmula descrita por ABDUL-BAKI e ANDERSON (1973): $IVP = \text{Comprimento de plântulas (cm)} \times \text{percentual de germinação}$. Os dados foram submetidos à análise de variância e suas médias comparadas por teste de médias.

Exemplo 2. Caracterização das bactérias como indutoras de resistência

Ensaio de indução de resistência no tomateiro à murcha de Fusarium

Foram consideradas as seguintes fontes de variação: Suspensões de *Bacillus* B12 e B47 (SUS.B12 e SUS.B47), pó de mandioca + *Bacillus* B12 e B47 (MAN.B12 e MAN.B47), pó de araruta + *Bacillus* B12 e B47 (ARA.B12 e ARA.B47), pó de alginato de sódio + *Bacillus* B12 e B47 (ALG.B12 e ALG.B47), QUARTZ® (fungicida à base de *B. methylotrophicus*); além de tratamentos controle constituídos pela aplicação das formulações com água Destilada e Deionizada (H2O DD), como segue: pó de mandioca + H2O DD (MAN.CRT), pó de araruta + H2O DD (ARA.CRT), alginato + H2O DD (ALG.CRT) e H2O DD (CONTROLE).

As sementes de tomate cv. Santa Cruz foram microbiolizadas com suspensão de *B. methylotrophicus* pela imersão das sementes nas suspensões líquidas e misturas nas formulações em pó na proporção de 20 g/kg de semente.

Para o experimento de indução de resistência as mudas foram produzidas em bandejas e, 15 dias após a semeadura ocorreu o transplante para vasos de 5,0 L contendo solo e esterco bovino autoclavados, na proporção 1:3, mantendo-se três plantas.vaso⁻¹ correspondendo a uma unidade experimental. Trinta dias após a semeadura realizou-se a inoculação de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, proveniente da coleção de microrganismos do Laboratório de Fitopatologia da UEMA, sobre registro MGSS 42, através da deposição de 60 mL da suspensão de inóculo (1×10^6 conídios.ml⁻¹) em cada vaso.

As plantas de tomateiro foram mantidas em casa de vegetação até o término das avaliações. O delineamento experimental para a análise de indução de resistência e controle da doença foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial, com 13 (tratamentos) x 2 (presença/ausência do patógeno) com 04 repetições, sendo uma parcela representada por um vaso contendo três plantas.

Foram coletadas amostras de folhas 24, 48 e 240 horas após a inoculação do patógeno para avaliação da produção de PR-proteínas. A avaliação da severidade da doença foi realizada aos 21 dias após a inoculação através de escala de notas de SANTOS (1999), de 1 a 5 avaliando os sintomas externos, sendo nota 1 dada as plantas saudáveis, nota 2 para as plantas doentes com sintoma vascular leve, nota 3 para as plantas com sintoma de amarelecimento foliar e escurecimento vascular, nota 4 para as plantas com murcha severa associada a escurecimento vascular, necrose foliar e clorose e nota 5 para as plantas mortas. Os resultados da severidade foram expressos em percentual de controle da doença.

Os dados foram submetidos à análise de variância e suas médias comparadas por testes de média.

Produção de biofertilizante

A produção dos biofertilizantes contendo a linhagem de *Bacillus methylotrophicus* MGSS 12 e MGSS 47 foi realizada na sede do laboratório de Fitopatologia, pertencente ao Núcleo de Biotecnologia Agrônômica da universidade Estadual do Maranhão, localizada em São Luís, através da infestação dos materiais em pó.

Formulações em pó foram preparadas misturando-se assepticamente 400 mL de suspensão bacteriana com 10^8 ufc/mL, com 1,0 kg de pó de mandioca (*Manihot esculenta* L.), araruta (*Maranta arundinacea* L.), separadamente.

A suspensão bacteriana é previamente preparada pela adição de fragmentos de meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA) em meio de cultura líquido Batata-Dextrose, composto por 200 g de batata cozida e 20 g de Dextrose. O meio de cultura foi armazenado em Erlenmeyer de vidro com bocal fechado com bucha de algodão e esterilizado em autoclave a 121°C e 20 minutos. Preparou-se meios de culturas individualizados para cada isolado bacteriano.

Após 24 horas, o meio de cultura foi inoculado. A suspensão bacteriana ficaram em repouso em câmara de incubação tipo BOD por 10 dias a temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas sob luz branca fluorescente. Após transcorrido o tempo de 10 dias, leituras espectrofotométricas foram realizadas para quantificação da concentração bacteriana e está é ajustada para 10^8 unidades formadoras de colônia / mL (ufc/mL).

Os substratos em pó de mandioca e araruta foram provenientes de produção comercial de féculas e/ou produção artesanal de agricultores familiares.

Os substratos em pó foram previamente esterilizados em autoclave a 121 °C, durante 20 minutos.

Foram utilizados dois isolados de *Bacillus methylotrophicus* nativos do Maranhão e extraídos de plantios de arroz no estado - MGSS B12 e MGSS B47. Tais isolados são provenientes da coleção de microrganismos do Laboratório de Fitopatologia da UEMA, sobre registro MGSS B12 e MGSS B47.

O preparo das formulações é realizado em câmara de fluxo laminar previamente esterilizada por banho de radiação UV durante 30 min. A suspensão bacteriana é injetada aos substratos em pó por auxílio de pipeta volumétrica de precisão na proporção de 400 mL de suspensão para cada 1,0 kg de fécula. O material é homogeneizado por 30 minutos em agitador de bancada (Shaker) a fim de maximizar o contato da suspensão bacteriana com o substrato em pó. Se, depois de transcorrido o tempo de 30 minutos, ainda for verificada má homogeneização do material, novo ciclo de 30 minutos é iniciado a fim de estabilizar a homogeneização.

Após o preparo, as formulações permanecem armazenadas em câmara de incubação tipo BOD por 30 dias em temperatura de 25±2 °C e fotoperíodo de 12 horas sob luz branca fluorescente.

Após o armazenamento inicial, o material é acondicionado em temperatura ambiente e testado a viabilidade das células bacterianas mensalmente através do reisolamento em meio de cultura BDA e quantificação por contagem indireta de células bacterianas através de método adaptado de LUDWIG et al. (2004), que consisti da adição de 25 ml de solução salina (NaCl 0,85 %) a cada formulação, sendo a concentração definida por espectrofotometria a 540 nm.

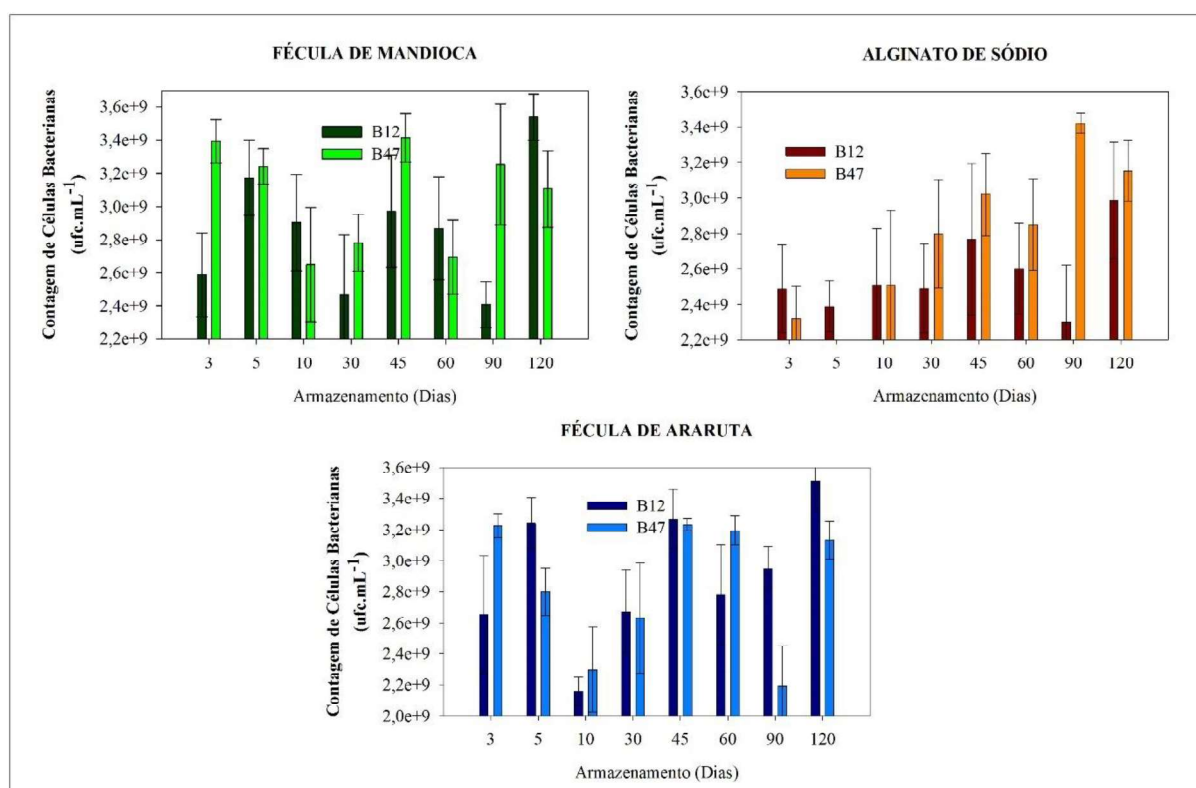
Cada formulação fica armazenada em tubos Falcon de polipropileno individuais, armazenados em triplicatas. A tampa dos tubos foi vedada com auxílio de filme de PVC plástico esticável. O preparo das formulações resulta em quatro (04) formulações diferentes, como segue:

- Pó de mandioca (*Manihot esculenta* L.) contendo *B. methylotrophicus* - MGSS B12
- Pó de mandioca (*Manihot esculenta* L.) contendo *B. methylotrophicus* - MGSS B47
- Pó de Araruta (*Maranta arundinacea* L.) contendo *B. methylotrophicus* - MGSS B12
- Pó de Araruta (*Maranta arundinacea* L.) contendo *B. methylotrophicus* - MGSS B47

Ensaio de eficiência de formulações para veiculação de *Bacillus methylotrophicus*

A figura 1 mostra a taxa de colonização das formulações pelos isolados de *B. methylotrophicus* utilizados. Percebe-se que houve um crescimento exponencial do número de células bacterianas colonizando os materiais. Este fato demonstra que, além de propício à veiculação da bactéria, permite a sobrevivência do inóculo. As féculas de mandioca, araruta e o alginato de sódio serviram de substrato para o aumento do número de células bacterianas provavelmente por ser fonte de carboidratos de fácil degradação e assimilação por microrganismos, a exemplo das elevadas taxas de amido presentes nos materiais.

Figura 1: Taxa de colonização de isolados *B. methylotrophicus* (MGSS B12 e MGSS B47) em diferentes formulações armazenadas a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas



Percebe-se que a taxa de colonização variou visivelmente em função do isolado de *B. methylotrophicus*, e do produto utilizado, ocorrendo uma flutuação do número de células entre $2,0 \times 10^9$ e $3,6 \times 10^9$, valores considerados significantes, quando comparados ao crescimento médio dessas bactérias em meio de cultura BDA. Essa flutuação pode ser explicada pela hipótese da cultura em sistema contínuo (MADIGAN et al., 2010), onde ocorre a renovação constante de nutrientes e a remoção de produtos do metabolismo.

A oferta de nutrientes e condições favoráveis à sobrevivência do microrganismo determina a provável viabilidade temporal de utilização da formulação como um transportador

de *B. methylotrophicus* a ser utilizado no manejo de doenças de plantas cultivadas ou como promotor de crescimento vegetal, tema de nossa pesquisa.

Analisando a tabela 1 verifica-se que, por mais que exista uma flutuação da concentração de células nas formulações constatada na figura 2, ocorre uma estabilidade do conteúdo de células bacterianas quando comparamos os formulados entre si. Nota-se que, tanto para o isolado MGSS B12 quanto para o MGSS B47, a taxa de colonização foi maior nas féculas naturais nas avaliações iniciais, se comparadas ao alginato de sódio, que só conseguiu obter valor semelhante às féculas aos 10 dias de armazenamento, mantendo-se constante a partir de então.

Tabela 1: Taxa de colonização de isolados *B. methylotrophicus* (MGSS B12 e MGSS B47) em diferentes formulações armazenadas a 25 °C e fotoperíodo de 12h

Formulação	<i>Bacillus</i>	Contagem de Células Bacterianas (ufc.mL ⁻¹)															
		Armazenamento (dias)															
		3				5				10				30			
Mandioca	MGSSB12	2,6E+09	ab*	3,0E+09	A**	3,2E+09	ab	3,2E+09	A	2,9E+09	a	2,8E+09	A	2,5E+09	a	2,6E+09	A
Mandioca	MGSSB47	3,4E+09	a	2,9E+09	AB	3,2E+09	a	3,0E+09	A	2,2E+09	a	2,2E+09	A	2,7E+09	a	2,7E+09	A
Araruta	MGSSB12	2,7E+09	ab	2,4E+09	B	2,4E+09	bc	2,2E+09	B	2,5E+09	a	2,6E+09	A	2,5E+09	a	2,6E+09	A
Araruta	MGSSB47	3,2E+09	ab	2,0E+09		2,0E+09	c			2,6E+09	a			2,8E+09	a		
Alginato	MGSSB12	2,5E+09	ab														
Alginato	MGSSB47	2,3E+09	b														
		45				60				90				120			
Mandioca	MGSSB12	3,0E+09	a	3,2E+09	A	2,9E+09	a	2,8E+09	A	2,4E+09	abc	2,8E+09	A	3,5E+09	a	3,3E+09	A
Mandioca	MGSSB47	3,4E+09	a	2,7E+09		2,7E+09	a	3,0E+09	A	3,3E+09	ab	2,6E+09	A	3,1E+09	a	3,3E+09	A
Araruta	MGSSB12	3,3E+09	a	2,8E+09		2,8E+09	a	2,9E+09	A	2,9E+09	abc	3,5E+09	A	3,5E+09	a	3,3E+09	A
Araruta	MGSSB47	3,2E+09	a	3,2E+09	A	3,2E+09	a	2,2E+09		2,2E+09	c	3,1E+09	A	3,1E+09	a	3,3E+09	A
Alginato	MGSSB12	2,8E+09	a	2,6E+09		2,6E+09	a	2,3E+09		2,3E+09	bc	3,0E+09	A	3,0E+09	a	3,1E+09	A
Alginato	MGSSB47	3,0E+09	a	2,8E+09		2,8E+09	a	2,7E+09	A	3,4E+09	a	2,9E+09	A	3,2E+09	a	3,1E+09	A

* Médias seguidas da mesma letra minúscula, nas colunas, não diferem diferem entre si na interação Formulação x *Bacillus* (Tukey, p<0,005)

** Médias seguidas da mesma letra maiúscula, nas colunas, não diferem diferem entre si em função da Formulação (Tukey, p<0,001)

Uma análise mais aprofundada mostrou que, dependendo do isolado utilizado, mudou-se também o comportamento dele junto à formulação. Para o isolado MGSS B47, o alginato mostrou-se o melhor veículo ao término dos 90 dias de avaliação, sendo inclusive superior ao armazenamento do isolado MGSS B12 no mesmo produto. Porém a estabilidade entre as formulações é notória ao longo das avaliações, afirmando que as féculas naturais são excelentes veículos para as células bacterianas.

Baseado nesses dados levanta-se uma possível hipótese a ser testada, a combinação de isolados de *B. methylotrophicus* e combinação de produtos pode aumentar a vida útil do produto e a taxa de colonização da formulação por células bacterianas.

Ensaio de valiação de Bacillus sp. como promotor de crescimento de plantas e colonizador dos tecidos vegetais

Observou-se capacidade de promoção de crescimento nas plantas de tomateiro em condições de casa de vegetação, através da veiculação das bactérias com as formulações testadas (Figuras 2 e 3). Destacaram-se todas as variáveis testadas (altura de plantas, comprimento de raiz, índice de vigor de plântulas, matéria seca de parte raiz e parte aérea e matéria seca total), estimulando maior crescimento em plantas de tomateiro.

Figura 2. Comprimento de parte aérea e sistema radicular de plantas de tomateiro (cm). IVP: índice de vigor de Plântulas. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

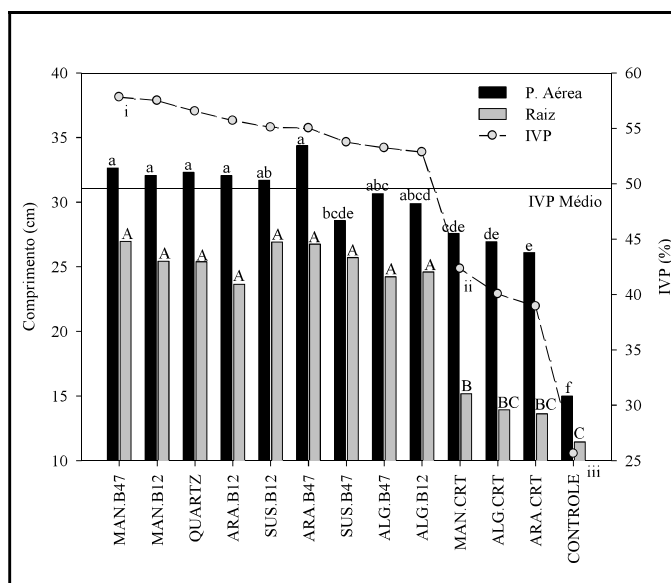
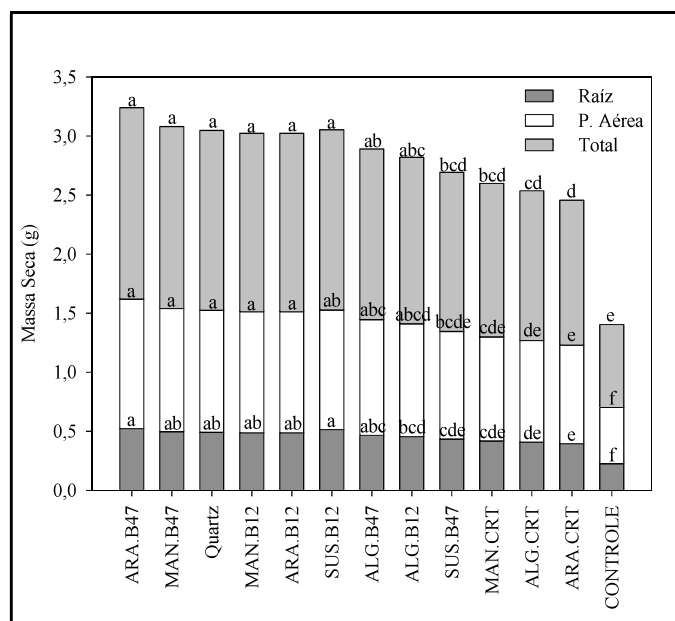


Figura 3. Massa seca de raiz, parte aérea e total de plantas de tomateiro. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.



Percebe-se que todos os tratamentos contendo *B. methylotrophicus* promoveram aumento do crescimento vegetal, com destaque ao comprimento do sistema radicular, onde todos os tratamentos diferiram dos controles, indicando o potencial das rizobactérias em favorecer boas condições ao desenvolvimento da rizosfera (Figura 2).

Destaque para as formulações à base de Mandioca e Araruta contendo os isolados nativos MGSS B12 e MGSS B47: os tratamentos promoveram significativo incremento no crescimento das plantas, assemelhando-se ao produto comercial Quartz[®]. Esses resultados reforçam o potencial biológico dos isolados testados, bem como a adaptabilidade destes quando armazenados em formulações de baixo custo econômico e ambiental.

Os materiais utilizados não devem interferir na interação bactéria-planta para serem considerados veículos minimamente aceitáveis e adequados para a prática agrícola, além disso devem fornecer condições ideais ao bom desenvolvimento e armazenamento das cepas bacterianas.

RPCV são excelentes sistemas modelo que podem fornecer biotecnologia com novos constituintes genéticos e produtos químicos bioativos com diversos usos na agricultura

sustentável, fornecendo controle de doenças que não podem ou são parcialmente gerenciadas por outras estratégias de controle.

Os tratamentos à base alginato sódio não diferiram dos controles quanto o comprimento da parte aérea. Foi observado que o alginato produziu uma mucilagem espessa ao redor das sementes, que pode ter atrasado a emergência e/ou desenvolvimento da parte aérea para esses tratamentos.

Conciliados à excelente taxa de germinação para todas as sementes (superior a 94 %), o valor de IVP médio demonstra que todas as plantas tratadas com *B. methylotrophicus* tiveram rápido desenvolvimento vegetativo, sendo superiores aos tratamentos controle (Tukey, $p < 0,05$) o que lhes conferem alta capacidade de sobrevivência, vigor e estabilidade de produção.

Os tratamentos contendo somente as formulações de pó de mandioca, araruta e alginato de sódio sem a presença do *B. methylotrophicus* apresentaram IVP semelhantes estatisticamente entre si, enquanto a testemunha apresentou os menores valores para todos os parâmetros de crescimento avaliados.

Os valores de matéria seca corroboram com os padrões de crescimento apresentados anteriormente (Figura 7). Todos os tratamentos contendo *B. methylotrophicus* apresentaram valores significativos de massa seca de raiz, parte aérea e total, se comparados com os tratamentos controles, com exceção dos tratamentos à base alginato sódio e o tratamento com suspensão de *Bacillus* MGSS B47, que se assemelharam a alguns controles, mesmo diferindo da testemunha absoluta, que continha somente água.

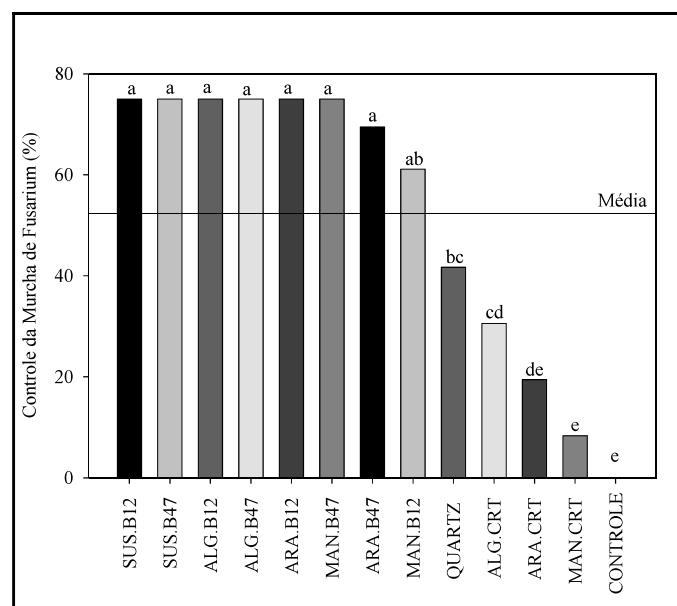
O acúmulo total de biomassa seca promovido pelos tratamentos com *B. methylotrophicus* nativos em formulações de Mandioca e Araruta representa significativo avanço na busca por formulações bioativas promissoras, sendo os dados lineares com os encontrados para tamanho de tamanho de plantas (parte aérea e sistema radicular) e IVP.

Esse incremento notável no crescimento vegetal somado a acúmulo de biomassa pode ser explicado porque várias estirpes de *Bacillus* spp. e outras RPCV têm a capacidade de promover o crescimento e incremento no rendimento das culturas através de uma maior absorção de nutrientes estimulados por fatores de promoção do crescimento como expressão de genes precursores de AIA e GA₃ e diminuição do nível de etileno devido à colonização da raiz (CHEN et al., 2007).

Uso dos biofertilizantes contendo *Bacillus* sp. como Indutor de Resistência no controle da Murcha de *Fusarium* do Tomateiro

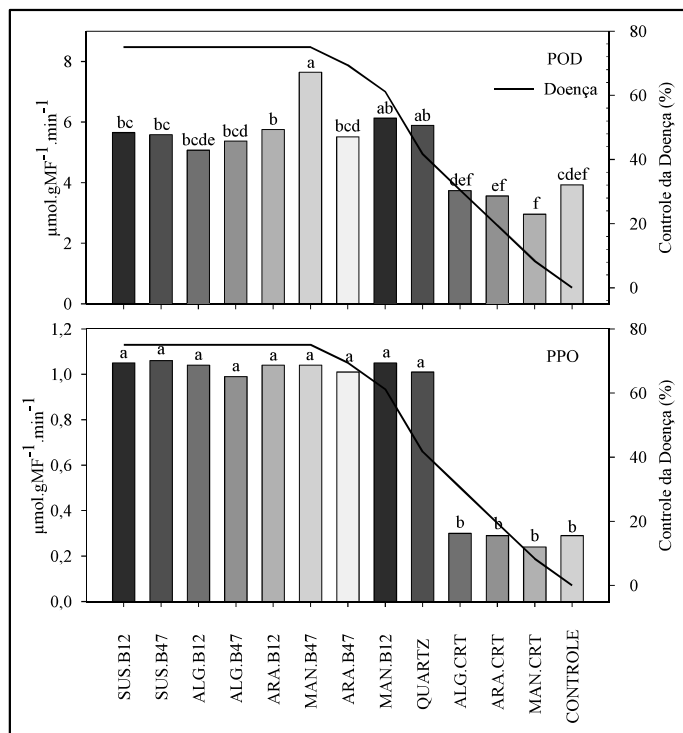
Entre as formulações testadas, somente o Quartz[®] limitou-se no controle da murcha de *Fusarium*, controlando apenas 60 % da doença (Figura 3). Os demais tratamentos contendo suspensão de *B. methylotrophicus* nativos do Maranhão apresentaram relevante redução na doença, com ausência de sintomas nas plantas e inibição superior a 70 % da doença, em comparação com a testemunha absoluta, que apresentou murcha severa associada a escurecimento vascular.

Figura 3. Controle da Murcha de *Fusarium* pela aplicação de formulações à base de *Bacillus methylotrophicus*. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.



Estes resultados eram esperados, visto que mudanças metabólicas importantes foram observadas se comparamos as diferenças significativas entre as atividades de PR-proteínas, confirmando houve ativação de resistência sistêmica na cultivar de tomateiro Santa Cruz, com controle de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* pela aplicação de formulações à base de *B. methylotrophicus* (Figuras 4 e 5).

Figura 4. Efeito das Formulações na produção de Peroxidade (POD) e Polifenoloxidade (PPO) 240 horas após a inoculação, no controle da murcha de fusarium em tomateiro. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.



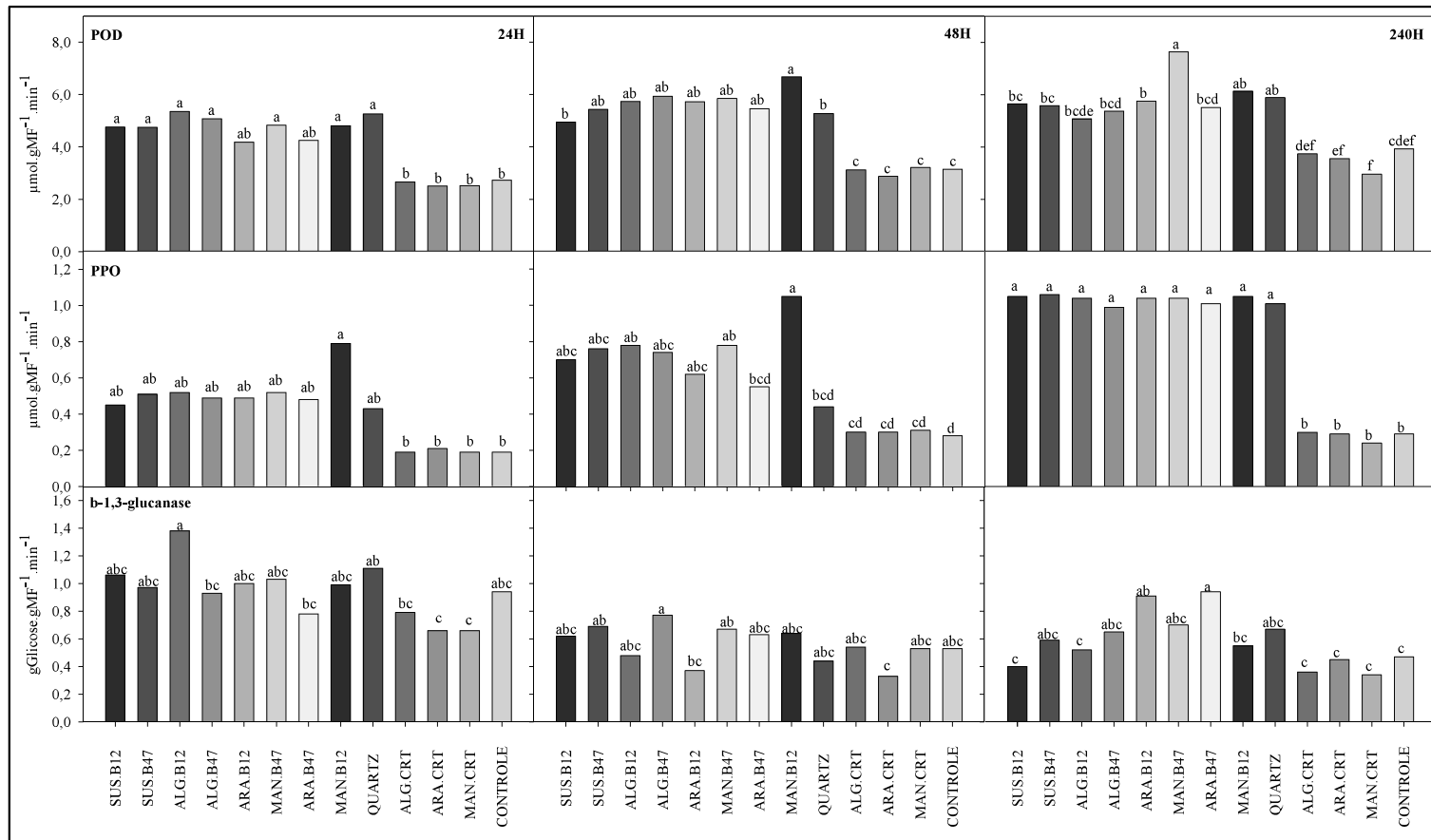


Figura 5. Atividades das enzimas Peroxidase (POD), Polifenoloxidase (PPO) e β -1,3-glucanase (β -1,3) em plantas de tomateiro 25, 48 e 240 horas após a inoculação de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Foi observada uma relação direta entre a ação das formulações na indução de atividade de Peroxidases e Polifenoloxidasas e o controle da doença, indicando que estas enzimas participaram ativamente no combate ao agente etiológico da Murcha (Figura 4).

Resultados semelhantes foram obtidos por SOTOYAMA et al. (2016) que verificaram o controle de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* com a aplicação de *B. amyloliquefaciens* com aplicação de real time-PCR para expressão relativa de várias PR-proteínas, como glucanase ácida, glucanase básica, quitinase ácida e quitinase básica.

Bactérias endofíticas promovem o crescimento vegetal e regulação de hormônios de defesa, podendo ser utilizados no controle ecológico de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* como sugerido por SHAHZAD et al. (2017) ao estudarem *B. amyloliquefaciens* em plantas de tomateiro.

As atividades de peroxidase e polifenoloxidase apresentaram valores crescentes ao longo das avaliações, diferindo significativamente dos tratamentos controles em cada avaliação (figura 5). ARAÚJO e MENEZES (2009) observaram diferença significativa na avaliação da atividade de peroxidase promovida por ASM, Azoxystrobin e *Bacillus subtilis* utilizados como indutores de resistência em plantas de tomateiro. Da mesma forma, (MANDAL et al., 2009) demonstraram que a atividade de Peroxidase apresentou um forte aumento em resposta a aplicação de ácido salicílico, análogo ao ASM, ao longo de 168 horas (7 dias) em plantas de tomateiro.

Valores elevados de PR-proteínas poucas horas após a aplicação do patógeno indicam a priori que a planta despertou ou constituiu fontes de defesa, característica primordial da indução descrita por diversos autores como um estado de alerta, onde a planta responde com maior agilidade e eficiência quando do estabelecimento do patógeno desafiante.

Para diversos autores, a aplicação de indutores de resistência promove a ativação da RSA, ocorrendo uma marcante redução nos sintomas da doença uma vez que ocorre inicialmente na região da infecção, buscando impedir ou retardar a penetração do patógeno (MEI et al., 2014; KIM et al., 2015).

Os dados corroboram com os resultados encontrados por AKRAM et al. (2015), que avaliaram a aplicação de *B. subtilis* contra murcha de fusarium de tomate e determinaram a concentração de enzimas como fenilalanina amônia-liase, polifenoloxidase e peroxidase, com expressivo aumento das atividades de PPO e POD.

O valores de β -1,3-glucanase apresentaram pouca diferença estatística, se comparados aos tratamentos controles, além de decrescerem ao longo das coletas. Esses resultados divergem

dos encontrados por SOLANKI et al. (2012), que encontraram expressão gênica e amplificação de β -1,3-glucanase em plantas tratadas com cepas de *Bacillus* spp. contra *Rhizoctonia solani* em tomate.

Reivindicações

COMPOSIÇÃO DE BIOFERTILIZANTE PARA A PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E CONTROLE DE FITOPATÓGENOS EM OLERÍCOLAS

1. Composição de biofertilizante à base de *Bacillus methylotrophicus* provenientes da coleção de microrganismos do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, sobre registro MGSS B12 e MGSS B47 que favoreçam a promoção de crescimento e a imunização de olerícolas contra o ataque de fitopatógenos.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a referida composição biofertilizante modula fatores promotores de crescimento e/ou indutores de resistência contra fitopatógenos.

3. Composição biofertilizante caracterizada por compreender:

- a) pelo menos um material biológico de espécies e/ou linhagens escolhidas que compreende *Bacillus methylotrophicus* MGSS B12 e MGSS B47.
- b) veículo agriculturalmente aceitável.

Resumo

COMPOSIÇÃO DE BIOFERTILIZANTE PARA A PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E CONTROLE DE FITOPATÓGENOS EM OLERÍCOLAS

A presente invenção descreve a composição de biofertilizante à base de bactérias promotoras de crescimento vegetal e antagonistas a fitopatógenos. Na maioria dos resultados, os biofertilizantes da presente invenção mostraram eficiência no processo de promoção de crescimento vegetal, com significativo desenvolvimento de biomassa área e radicular, alcançando maiores índices de vigor de plântulas e consequentemente qualidade no plantel. Além disso, demonstram também que a ativação de enzimas de defesa vegetal, aumentando a atividade de peroxidases e polifenoloxidasas em plantas de tomateiro, promovendo significativa redução da murcha de fusarium sob as condições estudadas.

. Os biofertilizantes da presente invenção compreendem as linhagens de *Bacillus methylotrophicus* MGSS 12 e MGSS 47. Os dados apresentados aqui se encontram parcialmente publicados, além disso, experimentos adicionais serão necessários.

REFERÊNCIAS

BDUL-BAKI, A. A.; ANDERSON, J. D. Vigor Determination in Soybean Seed by Multiple Criteria1. **Crop Science**, v. 13, n. 6, p. 630-633, 1973. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.2135/cropsci1973.0011183X001300060013x> >.

AKRAM, W.; ANJUM, T.; ALI, B. Searching ISR determinant/s from *Bacillus subtilis* IAGS174 against *Fusarium* wilt of tomato. **BioControl**, v. 60, n. 2, p. 271-280, April 01 2015. ISSN 1573-8248. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s10526-014-9636-1> >.

ARAÚJO, F. F.; MENEZES, D. Indução de resistência a doenças foliares em tomateiro por indutores biótico (*Bacillus subtilis*) e Abiótico (Acibenzolar-S-Metil). **Summa Phytopathologic**, Botucatu, v. 35, n. 3, p. 169-172, 2009.

CHEN, X. H.; KOUMOUTSI, A.; SCHOLZ, R.; EISENREICH, A.; SCHNEIDER, K.; HEINEMEYER, I.; MORGENSTERN, B.; VOSS, B.; HESS, W. R.; REVA, O.; JUNGE, H.; VOIGT, B.; JUNGBLUT, P. R.; VATER, J.; SUSSMUTH, R.; LIESEGANG, H.; STRITTMATTER, A.; GOTTSCHALK, G.; BORRIS, R. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. **Nat Biotech**, v. 25, n. 9, p. 1007-1014, 2007. ISSN 1087-0156. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nbt1325> >.

KIM, J.-S.; LEE, J.; LEE, C.-H.; WOO, S. Y.; KANG, H.; SEO, S.-G.; KIM, S.-H. Activation of Pathogenesis-related Genes by the Rhizobacterium, *Bacillus* sp. JS, Which Induces Systemic Resistance in Tobacco Plants. **The Plant Pathology Journal**, v. 31, n. 2, p. 195-201, 2015. ISSN 1598-2254 2093-9280. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4454002/> >.

LUDWIG, J.; MOURA, A. B.; SANTOS, A. S.; LORENSI, J. Incidência de *Gerlachia oryzae* em lotes de sementes microbiolozadas com isolados de bactérias biocontroladoras. Simpósio Brasileiro de Patologia de Sementes, 2004. João Pessoa. Anais... p.184.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. **Brock Biology of Microorganisms**. 13th edition. San Francisco: Pearson Benjamin-Cummings, 2010. p.

MANDAL, S.; MALLICK, N.; MITRA, A. Salicylic acid-induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, p. 642-649, 2009.

MEI, L.; LIANG, Y.; ZHANG, L.; WANG, Y.; GUO, Y. Induced systemic resistance and growth promotion in tomato by an indole-3-acetic acid-producing strain of *Paenibacillus*

polymyxa. **Annals of Applied Biology**, v. 165, n. 2, p. 270-279, 2014. ISSN 1744-7348. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/aab.12135> >.

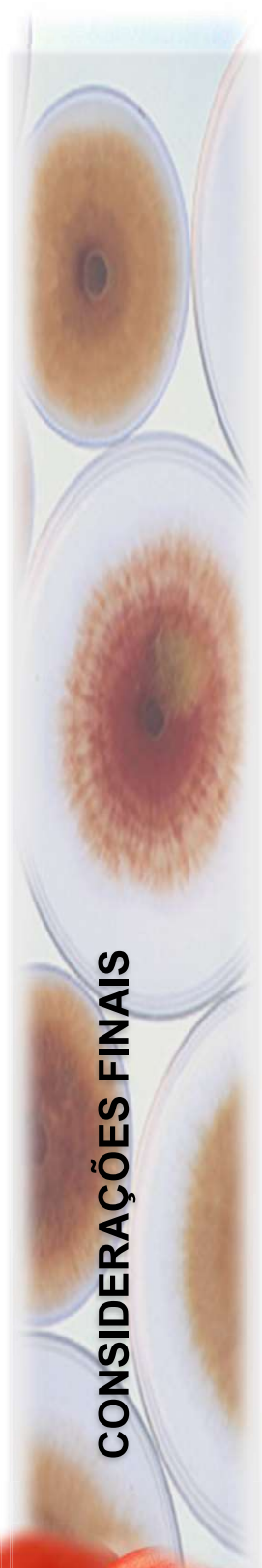
SANTOS, J. R. M. **Protocolo de Tecnologia: Seleção para resistência a doenças em hortaliças. N.3 Tomateiro/Murcha-de-fusario**. EMBRAPA Hortaliças - Comunicado Técnico 11. 1999

SHAHZAD, R.; KHAN, A. L.; BILAL, S.; ASAF, S.; LEE, I.-J. Plant growth-promoting endophytic bacteria versus pathogenic infections: an example of *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato. **PeerJ**, v. 5, p. e3107, 2017/03/16 2017. ISSN 2167-8359. Disponível em: < <https://doi.org/10.7717/peerj.3107> >.

SOLANKI, M. K.; ROBERT, A. S.; SINGH, R. K.; KUMAR, S.; PANDEY, A. K.; SRIVASTAVA, A. K.; ARORA, D. K. Characterization of Mycolytic Enzymes of *Bacillus* Strains and Their Bio-Protection Role Against *Rhizoctonia solani* in Tomato. **Current Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 330-336, September 01 2012. ISSN 1432-0991. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0160-1> >.

SOTOYAMA, K.; AKUTSU, K.; NAKAJIMA, M. Biological control of *Fusarium* wilt by *Bacillus amyloliquefaciens* IUMC7 isolated from mushroom compost. **Journal of General Plant Pathology**, v. 82, n. 2, p. 105-109, March 01 2016. ISSN 1610-739X. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s10327-015-0641-8> >.

CONSIDERAÇÕES FINAIS



CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente as medidas de controle sugeridas para diminuir perdas ocasionadas por essa doença são pouco eficientes e há um déficit de cultivares resistentes disponíveis no mercado. O problema ganha maior importância em função da variabilidade de raças do fungo promotoras da doença.

Este trabalho abre a possibilidade do manejo ecológico da cultura do tomateiro através da promoção do crescimento vegetal pelo estímulo de aumento da produção de ácido indol acético, aliada ao controle da murcha de fusarium do tomateiro, gerando conhecimento básico sobre aspectos bioquímicos envolvidos na defesa do tomateiro sob cultivo protegido.

A tese abre novas linhas de pesquisa com as bactérias testadas, sendo estas:

1. Testes em condições de campo em diferentes localidades.
2. Testes qualitativos e quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal.
3. Avaliação do efeito de formulações contendo os dois isolados MGSS B12 e MGSS B47.



ANEXOS

1. NORMAS DA REVISTA AUSTRALIAN JOURNAL OF CROP SCIENCE

Full Research Papers

1) The journal language is English. British English or American English spelling and terminology may be used in article. Please provide your manuscript in double-spaced (or 1.5), Times and New Roman font (size 12) left alignment, Word format. Contributors who are not native English speakers are strongly encouraged to ensure that a colleague fluent in the English language, if none of the authors is so, has reviewed their manuscript. The journal has an option to facilitate language correction of manuscripts, if the authors are not sure about the correctness of manuscript grammar and spelling.

2) Style of papers Original research papers should generally not exceed 12 pages of printed text, excluding references, tables and figures legends (one page of printed text = approx. 600 words). A manuscript for a research paper should be assembled in the following order: Title, Author (s), Affiliation(s) (if the senior author is not the corresponding author, this is indicated) Keywords, Abbreviations, Abstract, Introduction, Results, Discussion (results and discussion may be combined), Materials and methods, Conclusion, Acknowledgments, References. Tables and figures (JPEG/75 DPI or even higher) should be placed at the end of manuscript, after reference section, and numbered consecutively (eg. for figures, Fig 1., Fig 2..... and for tables Table 1., Table 2. etc.). Please place tables and figures at the end of manuscript consecutively. Please make sure that the total size of your manuscript is not more than 2 MB for review purposes.

-----IMPORTANT FOR SUBMISSION PROCESS-----

A) During the submission process, when authors entered the abstract and clicked OK to proceed, if submission system asked to enter the abstract again, please ignore that message and click OK again to proceed. Please contact tony.elders@gmail.com, if you faced any problem during submission process.

B) The file size SHOULD NOT be more than 2 MB, otherwise you will encounter problems to submit. If so, please submit figures as supplementary data or turn your MS to PDF. This will reduce the file size.

C) Authors will be asked to download, sign and submit the copyright form (Consent to Publisher) as soon as they received the review report, when revisions requested by reviewers. Upon receipt of consent to publisher (the signed copyright form) authors are not allowed to withdraw their submission.

D) Papers are only considered for publication on the understanding that no substantial part has been, or will be, submitted/ published elsewhere. Publication of a paper in Australian Journal of Crop Science implies that papers will be distributed freely to researchers, for non-commercial purposes without any limitations. By submission of manuscripts to AJCS, authors agree to transfer consent to the publisher although a signed copyright form will be sought later (upon acceptance).

Research notes should not exceed six pages of printed text (one page of printed text = approx. 600 words), including references, tables and figures. A manuscript for a research note should be assembled in the following order: Title, Author(s), Affiliation(s) (if the senior author is not the corresponding author, this is indicated) Key words, Abstract, Abbreviations, Manuscript text, Acknowledgments, References. Tables and Figures (JPEG) should be cited in the appropriate area in the text with the legend and numbered consecutively (eg. for figures, Fig 1., Fig 2..... and for tables Table 1., Table 2. etc.)

Review papers should not exceed 15 pages of printed text, including references, tables and figures. A manuscript for a review should be assembled in the following order: Title, Author(s), Affiliation(s) (if the senior author is not the corresponding order, this is indicated) Keywords, Abstract, Abbreviations, Manuscript text, Acknowledgments, References. Tables and figures (JPEG) should be cited in the appropriate area in the text with the legend and numbered consecutively (eg. for figures, Fig 1., Fig 2. and for tables Table 1., Table 2. etc.).

Keywords: Please provide 5 to 10 key words in alphabetical order separated with semicolons, not included in the title.

Scientific or systematic name of plants and fungi etc. should be written in italic. eg. *Oryza sativa*; *in vitro*; *in vivo*. Abbreviation: Abbreviations and their explanations should be collected alphabetically arranged in a list. Examples: BA_6- benzylaminopurine; NAA_naphthaleneacetic acid. Some commonly used abbreviations (e.g., DNA; PCR) do not have to be explained.

Abstract: Please provide a short abstract between 150- 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references. Usually, the abstract summarizes the work reported and does not contain background information or speculative statements.

Introduction: This section should argue the case for your study, outlining only essential background, but should not include either the findings or the conclusions. It should not be a review of the subject area, but should finish with a clear statement of the question being addressed. Please provide a context for the report with respect to previous work done in the field. The literature should be cited.

Results: This should highlight the results and the significance of the results and place them in the context of other work. The final paragraph ought to provide a resume of the main conclusions.

Discussion: A comprehensive discussion section is required to justify the results. Normally a comparison between your results and results from previous works should be given in the Discussion. Materials and methods Please provide sufficient methodological details to allow a competent person to repeat the work. Tables, Graphs and Figures Tables, Graphs and Figures should be placed at the end of manuscript, after reference section, with the legends and numbered consecutively. For Figures and Graphs or illustrations just use Fig 1., Fig 2.etc. For Tables Just use Table 1., Table 2.etc.

Acknowledgments: Just mention a quick thanks to the fund providers, supporters, etc.

Cross-referencing: In the text, a reference identified by means of an author's name should be followed by the date of the reference in parentheses like Xue et al. (2011). In the text when there are more than two authors, only the first author's name should be mentioned, followed by 'et al.,' eg. Xu et al., (2016). In the event that an author cited has had two or more works published during the same year, the reference, both in the text and in the reference list, should be identified by a lower case letter.

All the below examples can be used in the text: According Mark (1986); (Smith, 1987a, b), (Jones, 1986; Elders et al., 1988), (Bullen and Bennett, 1990).

References:

A) Journal article: Smith J, Jones MJ , Houghton LD (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med.* 965:325–329.

B) Journal issue with issue editor: Smith J (ed) (1998) Rodent genes. *Mod Genomics J.* 14(6):126–233.

C) Book chapter: Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York. 4.

D) Paper presented at a conference: Chung S-T, Morris RL (1978) Isolation and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid from *Streptomyces fradiae*. Paper presented at the 3rd international symposium on the genetics of industrial microorganisms, University of Wisconsin, Madison, 4–9 June 1978.

E) Proceedings as a book (in a series and sub-series): Zowghi D et al (1996) A framework for reasoning about requirements in evolution. In: Foo N, Goebel R (eds) *PRICAI'96: topics in artificial intelligence*. 4th Pacific Rim conference on artificial intelligence, Cairns, August 1996.

F) Lecture notes in computer science (Lecture notes in artificial intelligence), vol 1114. Springer, Berlin Heidelberg New York, p 157. 6. Proceedings with an editor (without a publisher): Aaron M (1999) The future of genomics. In: Williams H (ed) *Proceedings of the genomic researchers*, Boston, 1999.

Liu, S. (2005, May). *Defending against business crises with the help of intelligent agent based early warning solutions*. Paper presented at the Seventh International Conference on Enterprise Information Systems, Miami, FL. Abstract retrieved from http://www.iceis.org/iceis2005/abstracts_2005.htm

Multimedia

□ *Television or radio program*

MacIntyre, L. (Reporter). (2002, January 23). Scandal of the century [Television series episode]. In H.

Cashore (Producer), *The fifth estate*. Toronto, Canada: Canadian Broadcasting Corporation.

□ *Film, video recording or DVD*

Kubrick, S. (Director). (1980). *The shining* [Motion picture]. United States: Warner Brothers.

□ *Online lecture notes and presentation slides (such as Moodle)*

Cress, C. M. (2009). *Curricular strategies for student success and engaged learning* [PowerPoint slides]. Retrieved from http://www.vtcampuscompact.org/2009/TCL_post/presenter_powerpoints/Christine%20Cress%20-%20Curricular%20Strategies.ppt

Web pages

□ *Web pages and non-periodical documents on the Internet*

Library and Archives Canada. (2008). *Celebrating women's achievements: Women artists in Canada*.

Retrieved from <http://www.collectionscanada.gc.ca/women/002026-500-e.html>

Geography of Canada. (2009, September 29). In *Wikipedia, the free encyclopedia*. Retrieved

September 30, 2009, from http://en.wikipedia.org/wiki/Geography_of_Canada

5. Note

Please avoid using footnotes. Change footnotes to endnotes. Insert “(Note 1, Note 2)” in the running text and explain the note in an end notes section after the references page. Please see the template (<http://ccsenet.org/web/submissionguide>) for examples.

6. Appendix

The appendix comes after the references and the notes. In the text, refer to appendices by their labels: e.g., produced the same results for both studies (see Appendices A and B for complete proofs). Please see the template (www.ccsenet.org/submission) for examples.



HOME ABOUT USER HOME JOURNAL HOME PAGE

Home > User > Author > Submissions > #1703 > Summary

#1703 Summary

SUMMARY REVIEW EDITING

Submission

Authors	Jose Ribamar Muniz Campos Neto, Antonia Alice Costa Rodrigues, Rafael Ribeiro Chaves, Erlen Keila Candido e Silva, Anna Christina Sanazario de Oliveira, Diogo herison Silva Sardinha
Title	Indole acetic acid production and growth promotion of tomato plants by bacterial formulations
Original file	1703-3938-2-SM.DOCX 2018-07-25
Supp. files	1703-3939-1-SP.DOCX 2018-07-25 ADD A SUPPLEMENTARY FILE
Submitter	Sr. Jose Ribamar Muniz Campos Neto
Date submitted	July 25, 2018 - 10:31 AM
Section	Articles
Editor	None assigned

Status

Status	Awaiting assignment
Initiated	2018-07-25
Last modified	2018-07-25

Submission Metadata

[EDIT METADATA](#)

Authors

Name	Jose Ribamar Muniz Campos Neto
ORCID iD	http://orcid.org/0000-0001-5501-7473
Affiliation	Instituto Federal do Maranh�ai
Country	Brazil
Bio Statement	—
Name	Antonia Alice Costa Rodrigues
Affiliation	Universidade Estadual do Maranhao
Country	Brazil
Bio Statement	—
Principal contact for editorial correspondence.	
Name	Rafael Ribeiro Chaves
Affiliation	Universidade Estadual do Maranhao
Country	Brazil
Bio Statement	—
Name	Erlen Keila Candido e Silva
Affiliation	—
Country	—
Bio Statement	—
Name	Anna Christina Sanazario de Oliveira
Affiliation	—
Country	—
Bio Statement	—
Name	Diogo herison Silva Sardinha
Affiliation	—
Country	—
Bio Statement	—

Title and Abstract

Title	Indole acetic acid production and growth promotion of tomato plants by bacterial formulations
Abstract	

The objective of this study was to evaluate the promotion of plant growth mediated by the application of fresh suspensions and powder formulations of *Bacillus methylotrophicus* under greenhouse conditions, verifying morphological changes and variation in indole-acetic acid content in the plants. Powder formulations based on Cassava (*Manihot esculenta* L.), arrowroot (*Maranta arundinacea* L.) and sodium alginate containing *B. methylotrophicus*, in addition to the commercial product Quartz[®], were used to microbiolize the tomato seeds of the cultivar Santa Cruz. The formulations promoted plant growth, with a seedling vigor index greater than 50% for all treatments containing *Bacillus*, in addition to a significant increase in total dry matter. The treatments promoted a significant increase in the contents of indole acetic acid in tomato plants, mainly in the aerial part of the plant. It is concluded that the use of formulations containing *B. methylotrophicus* are efficient in promoting plant growth of tomato plants, with an increase in the production of indole acetic acid in vegetable tissues. Remarkable increase was observed in shoot length (15.91%), shoot dry weight (52.92%) and root dry weight (31.4%), vigor index (18.75%) and concentration of indole-acetic acid (22.22%) content of tomato biomass over control. These results demonstrate that isolates B12 and B47 has the promising PGPR attributes to be developed as commercial formulations to enhance agrossystem ambiental health and promote tomato plant growth.

Indexing

Academic discipline and sub-disciplines	Bacillus methylotrophicus, Morphological parameters, Phytohormone
-----------------------------------------	-------------------------------------------------------------------

USER

You are logged in as...

munizneto

- [My Journals](#)
- [My Profile](#)
- [Log Out](#)

OPEN JOURNAL SYSTEMS

[Journal Help](#)

NOTIFICATIONS

- [View](#)
- [Manage](#)

AUTHOR

Submissions

- [Active \(1\)](#)
- [Archive \(0\)](#)
- [New Submission](#)

FONT SIZE



INFORMATION

- [For Readers](#)
- [For Authors](#)
- [For Librarians](#)

Language en

Supporting Agencies

Agencies Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Maranhão (FAPEMA)

ISSN: 1835-2707