

PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS DE TOMATE
MEDIADA POR CONSÓRCIO MICROBIANO BACTÉRIA – FUNGO

RAFAEL CHAVES RIBEIRO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO / 2021

PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS DE TOMATE
MEDIADA POR CONSÓRCIO MICROBIANO BACTÉRIA – FUNGO

RAFAEL CHAVES RIBEIRO

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Fábio Lopes Olivares

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

MARÇO/2021

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

R484 Ribeiro, Rafael Chaves.

PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS DE TOMATE MEDIADA POR CONSÓRCIO MICROBIANO BACTÉRIA - FUNGO / Rafael Chaves Ribeiro. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2021.

90 f.

Bibliografia: 62 - 89.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2021.

Orientador: Fabio Lopes Olivares.

1. Rizobactérias. 2. Estimulante de crescimento vegetal. 3. Consórcios microbianos. 4. Interação bactéria-fungo. 5. Solanum lycopersicum.. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS DE TOMATE
MEDIADA POR CONSÓRCIO MICROBIANO BACTÉRIA – FUNGO

RAFAEL CHAVES RIBEIRO

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de mestre em Produção Vegetal.

Avaliação em 04 de março de 2021

Comissão Examinadora.



Pesq. Willian Pereira (D.Sc., Ciência do Solo) - UFRRJ



Prof. Silvaldo Felipe da Silveira (D.Sc., Fitopatologia) – UENF



Prof. Diego Lang Burak (Ph.D., Agronomia -Solos e Nutrição de Plantas) – UFES



Prof. Fábio Lopes Olivares (Ph.D., Ciência do solo) – UENF

(Orientador)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Ricardo Ribeiro e Marley Chaves, meus irmãos Ricardo e Rafaela, ao meu sobrinho Benicio Ricardo e a minha companheira Risley Belfort, a Deus, que está em tudo e em todos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser minha força e sabedoria;

À minha família, por todo carinho e cuidado dedicados ao longo de toda a minha vida;

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, pela oportunidade;

À CAPES, pela bolsa concedida;

Ao professor Fabio Lopes Olivares, pelo voto de confiança, apoio, ensinamentos, pela dedicada orientação e paciência;

Aos amigos Raudielle, Assistone e Rafael Rocha, Paulo Cavalcante, Silezio, Leticia e Eduardo, pela grande ajuda durante os experimentos;

Aos amigos do LBCT e NUDIBA, que direta ou indiretamente ajudaram para a conclusão deste trabalho, tornando mais agradáveis os momentos de estudo.

A todos, o meu muito obrigado!

SUMÁRIO

SUMÁRIO	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 <i>O tomateiro: Histórico, taxonomia e descrição</i>	4
2.1.1 Microrganismos promotores do crescimento vegetal	5
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Localização dos experimentos	20
3.1.1 Caracterização química do substrato	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1 Compatibilidade entre isolados bacterianos e fúngico	32
4.2 Resposta de crescimento de plantas de tomateiro inoculadas com diferentes combinações de isolados microbianos em casa de vegetal (ensaio I)	34
5. RESUMO E CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

RESUMO

RIBEIRO, Rafael Chaves, Mestrado, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Março de 2021. Título "**Promoção de crescimento de plantas de tomate mediada por consórcio microbiano bactéria – fungo.**" Orientador: Prof. Fábio Lopes Olivares.

O tomate está entre as hortaliças do tipo fruto mais consumido no mundo, a relevância dessa cultura para o agronegócio brasileiro e o aumento da participação dos bioinsumos no mercado global estimulam o desenho de uma nova geração de ativos biológicos para incremento da produtividade, aliadas a redução de custo e sustentabilidade ambiental. Com isso, o presente trabalho teve como objetivo (i) desenvolver um consórcio microbiano; (ii) analisar o desenvolvimento de mudas de tomateiro cv. Santa Cruz em resposta à inoculação de diferentes tratamentos biológicos, através da microbiolização das sementes e aplicação direta no solo, verificando o efeito nos aspectos agronômicos da cultura, avaliando o número mais provável - MNP de bactérias *diazotróficas*. Foram selecionados 5 isolados bacterianos (*Serratia marcescens* 22GI), (*Bacillus safensis* 77-B1 e J1.1-B2), (*Paraburkholderia silvatlantica* 101), (*Paraburkholderia* sp.103) e (*Herbaspirillum seropedicae* HRC54) e um isolado fúngico (*Trichoderma longibrachiatum* T476) para o desenvolvimento do consórcio microbiano. O ensaio (i) foi conduzido em DIC com arranjo fatorial constituído de 5 tratamentos (bacterianos) x 1 isolado (fúngico) x 3 repetições. O experimento foi conduzido *in vitro* verificando a compatibilidade

entre os microrganismos classificados de acordo com o crescimento do fungo sobre a bactéria em: alta, média e baixa, confirmados por microscopia óptica. O ensaio (ii) foi conduzido em DBC com arranjo fatorial constituído de substrato Basaplant autoclavado (A) e não autoclavado 2 x 26 tratamentos x 5 repetições. As sementes foram microbiolizadas com a suspensão dos isolados na concentração 10^9 para bactérias e 10^7 para o isolado fúngico pela imersão das sementes nas suspensões líquidas e quando misturas na proporção 1/1. O ensaio (ii.i) foi realizado em decorrência dos resultados obtidos no (ensaio ii) onde foram selecionados dois isolados bactérias (B2 e 22GI) para compor o consórcio microbiano. Os dados correspondentes ao efeito da inoculação sobre os aspectos agrônômicos analisados foram submetidos à análise de variância e Scott-Knott a 1% para o ensaio (ii) e para o ensaio (ii.i) foi analisado pelo teste Tukey com 1% de significância. Com os dados obtidos no ensaio (i), foi possível concluir que existe uma interação alta entre os isolados bacteriano e o fúngico, podendo observar que as células das bactérias foram capazes de se fixar, formando agregados-biofilmes na hifa do fungo. No ensaio (ii) e (ii.i) foi possível observar que a inoculação das sementes por isolados microbianos, tanto separado quanto em conjunto, influenciaram na promoção de crescimento e nos estágios iniciais das plantas de tomate, destacando todos os atributos morfo-fisiológicos avaliados, estimulando maior crescimento e desenvolvimento em plantas de tomateiro. Os resultados de contagem e NMP resultaram em maior atividade e sobrevivência dos isolados bacterianos quando co-inoculados com o isolado fúngico. A combinação adequada entre bactéria-fungos benéficos compatíveis representa um caminho aberto para criação de novos bioestimulantes e se caracteriza como uma alternativa viável e sustentável para os produtores na produção de mudas de tomateiro.

Palavras-chave: rizobactérias; estimulante de crescimento vegetal; consórcios microbianos; interação bactéria-fungo; *Solanum lycopersicum*.

ABSTRACT

RIBEIRO, Rafael Chaves, Mestrado, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. March 2021. Title “**Growth promotion of tomato plants mediated by microbial consortium bacteria – fungus**”. Advisor: Prof. Fábio Lopes Olivares.

Tomato is among the most consumed fruit vegetables in the world, the relevance of this crop to Brazilian agribusiness and the increased participation of biological inputs in the global market stimulate the design of a new generation of biological assets to increase productivity, combined with cost reduction and environmental sustainability. The present study aimed to (i) develop a microbial consortium; (ii) analyze the development of cv tomato seedlings. Santa Cruz in response to the inoculation of different biological treatments through the microbiolization of seeds and direct application in the soil verifying the effect on agronomic aspects of the crop, evaluating the Most Likely Number- MNP of diazotrophic bacterium five bacterial isolates (*Serratia marcescens* 22GI), (*Bacillus safensis* 77-B1 and J1.1-B2), (*Paraburkholderia silvatlantica* 101), (*Paraburkholderia* sp.103) and (*Herbaspirillum seropedicae* HRC54) and a fungal isolate (*Trichoderma longibrachiatum* T476)for the development of microbial intercropping. The assay (i) was conducted in IHD with a factorial arrangement consisting of 5 treatments (bacterial) x 1 isolated (fungal) x 3 replications, and the experiment was conducted in vitro verifying the compatibility. Between microorganisms that were classified

according to the growth of the fungus on the bacterium in high, medium, and low confirming themselves through optical microscopy. The assay (ii) was conducted in DBC with a factorial arrangement consisting of autoclaved Basaplant substrate (A) and non-autoclaved 2 x 26 treatments x 5 replications. The seeds were microbiolized with the isolates' suspension at concentration 10^9 bacterial isolates 10^7 for the fungal isolate by immersion of the seeds in the liquid suspensions and when mixtures in the ratio 1/1. The assay (ii.i) was performed because of the results obtained in (assay ii) where two bacteria isolate (B2 and 22GI) were selected to make up the microbial consortium. The data corresponding to the effect of inoculation on the agronomic aspects analyzed was submitted to variance analysis and Scott-Knott. 1% for the assay (ii) and the assay (ii.i) was analyzed by the Fisher LSD test with 5% significance. With the data obtained in the assay (i) it was possible to conclude that there is high interaction between bacterial isolates and fungal isolates, observing that bacteria cells could settle, forming biofilm aggregates in the hypha of the fungus. In the assay (ii) and (ii.i) it was possible to observe that the inoculation of seeds by microbial isolates both separately and together influenced the growth promotion and early stages of tomato plants, highlighting all the morphophysiological attributes evaluated, stimulating greater growth and development in tomato plants. The results and MPN resulted in higher activity and survival of bacterial isolates when co-inoculated with the fungal isolate. The appropriate combination of compatible beneficial bacteria-fungi represents an open path to creat new biostimulants and is characterized as a viable and sustainable alternative for producers in the production of tomato seedlings. ing new biostimulants and is characterized as a viable and sustainable alternative for producers in producing tomato seedlings.

Keywords: rizobacteria; plant growth stimulant; microbial consortia; bacteria-fungus Interaction; *Solanum lycopersicum*.

1. INTRODUÇÃO

A agricultura moderna tem enfrentado novos desafios no século XXI. Um deles é aumentar a produção das culturas com sustentabilidade. Assim a preocupação com o meio ambiente e a qualidade de vida vem se difundindo amplamente para além das correntes da agricultura agroecológica. Estratégias capazes de aumentar a produção de alimentos com baixo impacto ambiental têm crescido continuamente em função da demanda cada vez maior por produtos ecologicamente corretos (Costa et al., 2008).

O Brasil é um dos principais produtores de tomate, com uma produção superior a quatro milhões de toneladas. O Sudeste destaca-se como a segunda região de maior produção deste fruto, sendo o Estado do Rio de Janeiro o 4^o entre os produtores do Sudeste, com pouco mais de 3.671 toneladas em 189 hectares de área plantada (Ibge, 2019).

Na cadeia produtiva de hortaliças de boa qualidade, a formação de mudas é uma das fases mais importantes para o ciclo da cultura, influenciando diretamente no desempenho final da planta, tanto do ponto de vista nutricional como do produtivo, pois existe uma relação direta entre mudas saudáveis e produção a campo (Campanharo et al., 2006). Mudas bem formadas podem incrementar a produção, enquanto mudas malformadas, segundo Guimarães et al. (2002), podem ampliar o ciclo da cultura e, conseqüentemente causar prejuízos ao produtor. A relação de plantas com alguns microrganismos pode aumentar ou mesmo promover seu crescimento e desenvolvimento.

Diante da relevância que a cultura do tomate possui para o agronegócio brasileiro, proposições tecnológicas com impacto positivo sobre a produção de mudas e produtividade, aliadas a redução de custo de produção e sustentabilidade ambiental, emergem como demandas estratégicas para a evolução da cultura.

O estabelecimento de uma agricultura sustentável, que preserve o meio ambiente e proporcione segurança alimentar futura, é um fator primordial para o desenvolvimento da humanidade, ante as mudanças climáticas e o declínio das reservas energéticas não renováveis. Diante das previsões de crescimento populacional mundial, existe o desafio de criar métodos avançados e eficientes para aumentar a produção de alimentos e energia renovável sem, contudo, esgotar os recursos naturais.

À medida que a importância econômica da cultura do tomateiro aumenta, crescem os requisitos para melhorar a produtividade de maneira ambientalmente sustentável.

O desenvolvimento de uma ferramenta sustentável (inoculantes) para cultura do tomate é objetivo de pesquisas. Vários estudos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de reduzir a dependência por fertilizantes sintéticos pelo incremento da fixação biológica de nitrogênio (FBN), solubilização de fosfato e na promoção de crescimento de plantas. O uso de microrganismos que beneficiam o desenvolvimento de determinada cultura seja pela fixação biológica, solubilização de fosfatos ou promoção de crescimento é conhecido há muito tempo (Andrews, 1992).

O investimento em inovações ambientalmente corretas e economicamente viáveis é essencial para ofertar alternativas ao atual modelo de produção baseado, predominantemente, em insumos agrícolas poluidores e que demandam alto custo energético e uso de recursos naturais não renováveis.

Assim, microrganismos, seus produtos e processos na forma de insumos biológicos podem desempenhar um papel relevante nas mudanças dos paradigmas de produção agrícola, gerando inúmeras possibilidades para geração de inoculantes simples e mistos aplicados em plantas (Olivares et al., 2015).

A maioria das pesquisas relacionadas aos inoculantes está centrada em programas de seleção de microrganismos únicos, estes aplicados na planta. Todos os processos microbianos que ocorrem no sistema solo-planta resultam,

absolutamente, em interações múltiplas e complexas entre diferentes espécies, as quais são pouco exploradas científica e tecnologicamente.

A importância da coexistência de populações mistas de bactérias e fungos já foi demonstrada com estudos ecológicos na filosfera de diferentes espécies vegetais em ambiente de produção agroecológica como os de Baldotto e Olivares, (2008). Foi reportada a presença de relações estruturais íntimas entre hifas e esporos fúngicos associadas a colônias, variando de pequenos agregados até comunidades bacterianas estruturadas na forma de biofilmes.

Diferentes espécies de bactérias podem colonizar o micro-habitat chamado sapro-rizosfera que engloba a micosfera e micoplano de hifas de fungos e que servem como uma superfície biótica para ancoragem física, troca de sinais químicos e nicho nutricional (Ballhausen et al. 2016). Estudos ecológicos têm demonstrado os benefícios dos fungos na sobrevivência, dispersão e atividade das comunidades bacterianas no solo, rizosfera e tecido vegetal (Mallon et al. 2015).

A necessidade de equilibrar produtividade e sustentabilidade incentivou o desenvolvimento de alternativas para aumentar o rendimento das culturas. Nesse contexto, os produtos biológicos, tais como o consórcio de microrganismos associado à planta, emergiram como uma alternativa potencial, permitindo a exploração da diversidade microbiana para modular o crescimento, desenvolvimento, defesa de patógenos, aquisição de nutrientes e resistência ao estresse.

No presente estudo, diferentes isolados bacterianos promotores de crescimento vegetal, e o fungo saprofítico cepa UENF-22GI fungos *Trichoderma longibrachiatum* (TI-T476) UENF-T476 foram combinados para testar seu potencial quanto a um consórcio microbiano e suas propriedades de promoção de crescimento de plantas *in vitro*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O tomateiro: Histórico, taxonomia e descrição

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma hortaliça cosmopolita, originária das Américas, especificamente da região Andina. O centro de origem primário é um estreito território que faz fronteiras ao norte pelo Equador, ao sul pelo norte do Chile, a oeste pelo oceano Pacífico e a leste pela Cordilheira dos Andes. No entanto, a domesticação do tomateiro ocorreu por tribos indígenas primitivas do México, onde foi denominado de Tomate (Giordano, Ribeiro, 2000; Silva et al., 2007).

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 gênero denominado *Lycopersicon*, renomeando o tomateiro cultivado como *Lycopersicon esculentum* Mill. (Alvarenga, 2004). Até a realização de estudos filogenéticos das solanáceas, demonstrando que os tomates e espécies do gênero *Solanum* são muito próximos filogeneticamente, atribuindo novamente o tomate ao gênero *Solanum*, conforme determinado inicialmente por Linnaeus (Peralta, Spooner, 2006).

O tomateiro é uma solanácea herbácea, de caule flexível, cuja arquitetura natural se assemelha a uma moita, com muitas ramificações laterais (Filgueiras,

2008). Todavia, a arquitetura pode ser modificada pelo método de condução mais apropriado das plantas, conforme a variedade e finalidade, abrangendo práticas como poda apical, retirada de brotações laterais e raleio dos frutos, principalmente para frutos destinados ao segmento mesa, visando maior produção e qualidade (Marim et al., 2005).

O tomate, fruto do tomateiro, é a primeira hortaliça fruto de importância econômica no Brasil. Esta importância está ligada ao aspecto não só econômico, mas também social e, segundo o levantamento da FAO – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, o tomate é o décimo primeiro alimento mais produzido mundialmente, contando com aproximadamente 161 milhões de toneladas colhidas em 2012. O Brasil destaca-se com uma produção de aproximadamente 3,8 milhões de toneladas, colocando-se na 9ª posição da produção mundial no ano de 2012 (Fao, 2019).

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 associado à prevenção do câncer de próstata (Lopes, 2005).

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).

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 carotenoide licopeno. As sementes são pilosas pequenas e o sistema radicular é condicionado pelo tipo de cultura (Filgueira, 2000).

2.1.1 Microrganismos promotores do crescimento vegetal

O desenvolvimento de uma planta depende de uma série de fatores, dentre eles a relação planta-solo, que é a fonte de obtenção da maior parte dos nutrientes

necessários ao crescimento das plantas. Além de nutrientes, são encontrados nos solos diversos microrganismos que formam associações e interações com as plantas trazendo benefícios mútuos, como é o caso dos fungos e bactérias.

Os microrganismos podem interagir de diferentes formas com as plantas, funcionando coletivamente como um microbioma. O manejo da comunidade microbiana do solo é um aspecto importante da agricultura bem-sucedida e sustentável. O uso de microrganismos benéficos como promotores de crescimento vegetal para o aumento da produtividade das culturas tem sido intensamente estudado (Harman e Björkman, 1998; Lucy et al., 2004; Artursson et al., 2006; Berg, 2009), especialmente em cereais e hortaliças.

Outros atributos como a supressão de microrganismos patogênicos (biocontrole) (John et al., 2010), produção de fitohormônios (Li et al., 2011), solubilização de fosfatos (Singh e Reddy 2011) e indução de resistência (Fontenelle et al., 2011) podem ser igualmente explorados para fungos e bactérias promotores do crescimento vegetal. Estudos como de Wahid e Mehana, (2000) demonstraram sua relevância na nutrição mineral de plantas. Estes autores realizaram estudos inoculando fungos solubilizadores de P em plantas de trigo e observaram aumento significativo na disponibilidade de P no sistema aumentando, conseqüentemente, o rendimento dos grãos.

Além disso, a comunidade microbiana pode auxiliar na tolerância à alta salinidade e à seca que interferem no desenvolvimento e produtividade das plantas (CASTIGLIONI et al., 2008; ZHANG et al., 2008).

Várias espécies de fungos vêm sendo documentadas como excelentes solubilizadoras de fosfato como relatado por Vassilev e Vassileva (2003) que destacaram as espécies de *Trichoderma*, *Penicillium* e *Aspergillus* nesse contexto.

Fungos podem atuar na promoção do crescimento vegetal indiretamente, como demonstrado por John et al. (2010) que verificaram que *Trichoderma viride* pode atuar como um agente de biocontrole contra *Fusarium oxysporum* e *Pythium arrhenomanes*.

Trichoderma spp. é um fungo necrotrófico, não patogênico encontrado na maioria dos solos, especialmente em solos orgânicos, podendo viver saprofiticamente ou parasitando outros fungos (MELO et al., 2000).

Fungos do gênero *Trichoderma* são uns dos principais microrganismos de importância para o aumento do crescimento vegetal. Este fungo pode influenciar

positivamente a germinação de sementes, o desenvolvimento e rendimento das culturas. A produção de substâncias promotoras de crescimento, melhoria na nutrição das plantas principalmente pela solubilização de fósforo (Oliveira et al., 2012; Silva et al., 2012) e síntese de ácido indol acético (Oliveira et al., 2012; Chagas et al., 2016) são mecanismos induzidos pela inoculação com *Trichoderma*.

Uma parte da comunidade bacteriana do solo atua na promoção do crescimento vegetal, sendo reconhecidas como “bactérias promotoras do crescimento vegetal” (BPCV). No que diz respeito à interação estrutural as BPCV podem ocupar diferentes nichos no sistema solo-planta.

Dentre as características funcionais relacionadas à promoção do crescimento de plantas por microrganismos estão: a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico (N_2), solubilização de minerais de fosfatos a partir de fontes de P não disponível às plantas, a capacidade de produzir e secretar compostos com atividade similar à dos fitormônios e retardar ou impedir efeitos deletérios de patógenos (Vivanco-Calixto et al., 2016). Tais mecanismos estimulam o crescimento e desenvolvimento das plantas, seja pelo aumento direto na disponibilidade de nutrientes ou promovendo alterações na arquitetura do sistema radicular, incremento de biomassa, alterações nas relações biométricas entre raízes e parte aérea, aumento da germinação e indução da resistência a pragas e doenças (Dey et al., 2004).

As BPCV são capazes de disponibilizar nutrientes essenciais ao ciclo de vida dos vegetais, tais como nitrogênio, ferro e fósforo por meio de diferentes mecanismos (Chanway 1997). Outro efeito atribuído às BPCV é o aumento da área de exploração do sistema radicular com conseqüente aumento da absorção de água e nutrientes do solo. O principal mecanismo responsável por este fenótipo advém da secreção de auxinas e compostos com atividade similar a fitormônios pelas bactérias (Lee et al., 2004).

O incremento de biomassa, a área e o comprimento radicular, o número de raízes laterais e a densidade de pelos radiculares estão entre as modificações mais relatadas para as BPCV. vários trabalhos demonstraram os efeitos benéficos das bactérias endofíticas diazotróficas em plantas. A revisão de Olivares et al. (2017) demonstra o sucesso na promoção do crescimento vegetal de várias culturas quando inoculadas a estirpe HRC 54.

O conhecimento e a manipulação da microbiota das plantas podem configurar um recurso biotecnológico alinhado aos interesses de diminuição dos custos de produção e aumento da sustentabilidade na agricultura. Dessa forma, os MPCV também contribuem para aumentar a produção agrícola, tornar o produto mais competitivo e diferenciado e, ainda, diminuir os custos para o produtor (Machado et al., 2012).

Os consórcios microbianos permitem a otimização dos métodos biológicos exercidos pelos microrganismos. Diversos estudos abordam o uso de consórcios microbianos, remontando o conceito de comunidade microbiana para fins ambientais, industriais e agrícolas (Márquez-Rocha et al., 2001; Raja et al., 2006; Wongwilaiwalin et al., 2010).

Vários experimentos *in vitro* e *in vivo* têm sido realizados para verificar os mecanismos e os efeitos da interação entre esses microrganismos. Segundo Olivares et al. (2015), muitos resultados de experimentos indicam que há uma interação positiva entre o fungo *Trichoderma spp.* e isolados bacterianos na rizosfera e na colonização das raízes de plantas.

Diversos estudos têm demonstrado aumento na atividade metabólica da bactéria quando associadas em biofilmes e na hifosfera de fungos (Seneviratne e Jayasinghearachchi, 2003; (Jayasinghearachchi e Seneviratne, 2004; Roesti et al., 2006; Rinaudi et al., 2006). Diante dessa premissa, ensaios microbiológicos com abordagens sobre consórcios microbianos são importantes para o desenvolvimento de uma interação positiva benéfica visando o desenvolvimento de um produto biológico inovador.

Pesquisas envolvendo esses organismos têm como objetivo prático aumentar a produção, reduzir o uso de fertilizantes químicos e contribuir para alcançar um padrão de agricultura mais sustentável e menos dependente de insumos (Souza et al., 2006).

2.1.2 *Bactérias promotoras de crescimento vegetal*

Bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) são microrganismos de vida livre que fornecem efeitos positivos no desenvolvimento das plantas (Santos et al., 2020), que formam relações simbióticas específicas com plantas,

endófitos bacterianos que podem colonizar alguns ou grande parte dos tecidos de uma planta, e cianobactérias (Glick, 2012).

Essas bactérias colonizam tanto a região rizosférica quanto tecidos internos do vegetal (Baldani, Baldani, 2005; Huergo et al., 2008), apresentando motilidade guiada por mecanismo de localização quimiotáxica para ácidos orgânicos, açúcares, aminoácidos e compostos aromáticos exsudados pelas raízes (Steenhoudt; Vanderleyden, 2000), beneficiando-se dessas fontes de carbono e energia (Arshad et al., 2007).

Grande parte deste crescimento vegetal está relacionada a mecanismos importantes como: a fixação biológica de nitrogênio, solubilização e mineralização de fósforo, a produção de fitormônios, entre eles, o ácido indolacético (AIA), promovendo a absorção de água e de nutrientes, contribuindo no crescimento das gemas apicais (Oliveira et al., 2003; Santos et al., 2018).

As bactérias promotoras de crescimento podem colonizar o solo (ectorrizosfera) e se aderir à superfície da raiz através do rizoplaneo em alguma etapa de seu ciclo de vida, devido à disponibilidade de uma ampla fonte de nutrientes exsudados pelas raízes da planta. Após essa atração inicial, as bactérias penetram a planta e ocupam os espaços vazios em porções do córtex e da endoderme (endorrizosfera). Isso demonstra que as raízes são a principal porta de entrada para essas bactérias (Baldani et al., 2002).

Lopes e et al. (2019) mostraram que características da planta, como BRIX podem interferir na relação da espécie da bactéria, e que a inoculação pode ser possível em estágios iniciais de reprodução da planta. Por outro lado, já foram observadas mudanças estruturais consideráveis nas raízes em associação com bactéria do gênero *Burkholderia*, resultando no aumento da espessura da raiz (Paungfoo-Lonhienne et al., 2016).

Os mecanismos diretos são definidos como o emprego das características bacterianas que resultam na promoção direta do crescimento da planta (Olanrewaju et al., 2017), articulando os níveis de fitohormônios, facilitando a obtenção de nutriente como nitrogênio, fósforo e ferro (Santoyo et al., 2016).

O fitohormônio auxina é responsável pelo desenvolvimento de várias partes das plantas, como raízes, folhas e flores (Phillips et al., 2011). A auxina interage com a planta promovendo um alongamento celular, pois estão envolvidas na incorporação de materiais na parede celular, através do aumento da sua

plasticidade (Costa et al., 2011), podendo resultar em cana-de-açúcar 21% mais alta, com os entrenós mais distantes, aumentando, assim, o caule e conseqüentemente o acúmulo do caldo/da sacarose.

As citocininas são chamadas assim porque estimulam a divisão celular (citocinese) e o desenvolvimento de gemas laterais (Aguiar, 2012). Elas são derivadas de purinas que promovem e participam na divisão celular das plantas e no crescimento primário da raiz, sendo *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Azospirillum* os principais gêneros que as produzem (Diaz, 2018).

As giberelinas são sintetizadas em várias partes de uma planta, incluindo sementes em germinação e desenvolvimento, folhas em desenvolvimento e entrenós em alongamento (Taiz, et al., 2017). Elas também regulam positivamente a divisão celular e o alongamento, estimulando o crescimento do hipocótilo e do caule, e têm um efeito positivo no tamanho do meristema da raiz e da folha (Martínez et al., 2018). Algumas espécies bacterianas produtoras de giberelina incluem *Bacillus amyloliquefaciens* (Shahzad et al., 2017) e *Pseudomonas* spp (DESAI, 2017). *Bacillus pumilus* e *Bacillus licheniformis*, rizobactérias isoladas da rizosfera de amieiro (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn) com forte atividade promotora de crescimento vegetal, mostraram produzir giberilina fisiologicamente ativa.

O etileno é essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas, mas tem diferentes efeitos no crescimento desses vegetais dependendo de sua concentração nos tecidos radiculares (Martínez-Viveros et al., 2010).

A enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminase (E.C. 3.5.99.7) é responsável pela degradação de ACC (precursor do etileno) em amônia e α -cetobutirato. Bactérias produtoras de ACC desaminase são capazes de promover o crescimento de plantas através da redução dos níveis de etileno quando há alta produção deste regulador produzido pela planta (Nascimento, 2018).

Kruasuwan & thamchaipenet (2018) avaliaram a promoção de crescimento, tolerância ao sal e colonização da raiz da cana-de-açúcar através do endofítico *Enterobacter* sp. Foi constatado que a linhagem bacteriana, além de promover o crescimento do vegetal, aumento de clorofila total e acúmulo de K⁺, possui a capacidade de tolerar estresse salino, tornando futuramente um possível bioinoculante, contribuindo para o crescimento e a tolerância ao sal para uso na cultura de cana-de-açúcar.

Entre os nutrientes mais exigidos pela cana-de-açúcar, o nitrogênio (N) se destaca pela importância na nutrição e fisiologia da planta (Silva, 2016). Sua baixa disponibilidade no solo é devido às grandes perdas por emissão ou lixiviação, o que o torna um fator limitante em ecossistemas agrícolas (Martínez-Viveros et al., 2010).

Uma alternativa para reduzir o uso intensivo de fertilizantes químicos é a utilização de bactérias que realizam a fixação biológica de nitrogênio (FBN). As bactérias diazotróficas consistem num grupo de microrganismos capazes de converter o nitrogênio (N₂) presente na atmosfera em formas que podem ser assimiláveis pelas plantas (NH₃), por meio da FBN, processo esse diretamente influenciado pela enzima nitrogenase (Shin et al., 2016).

Entre as bactérias simbióticas mais estudadas estão *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium* (Zahran, 2001). No entanto, o avanço de estudos permitiu que hoje, sejam conhecidas diversas espécies de bactérias pertencentes a gêneros distintos com destaques para a *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* e *Burkholderia* (Perin, 2003; Reis Junior et al., 2000).

De acordo com Reis et al. (2020), a inoculação da *Nitrospirillum amazonense* na cultura de cana-de-açúcar na dosagem de 1,0 e 1,5 L.p.c.ha⁻¹, demonstrou um potencial para o crescimento vegetal, aumentando o diâmetro do caule, número de perfilhos, altura comprimento, número de entrenós e a produtividade da cultura.

Lira et al., (2020) analisaram oito tratamentos constituídos por bactéria diazotróficas - *Azospirillum amazonense*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Burkholderia tropica* - em duas variedades de cana-de-açúcar, e todos os tratamentos proporcionaram um melhoramento tanto na morfologia da cultura, quanto no teor de nutrientes. O destaque foi para *B. tropica* que favoreceu maior teor de N, expressando a melhor interação com as duas cultivares testadas para 25 fixação biológica de nitrogênio, quando comparada ao obtido com o tratamento de N mineral. Este resultado possibilita substituir totalmente a fertilização com nitrogênio mineral pela inoculação em campos de cana-de-açúcar, quando observado a interação específica com as cultivares testadas.

O fósforo (P) é um nutriente essencial para as plantas e, embora a reserva de P nos solos seja grande, devido à aplicação de fertilizantes, ele está presente principalmente na forma de compostos insolúveis que não podem ser absorvidos pelas plantas, limitando seu crescimento (Santos et al., 2020).

As bactérias dos gêneros *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Serratia*, têm demonstrado a capacidade para solubilizar fosfatos (Oteino et al., 2015).

O potássio (K) é o terceiro macronutriente mais importante e necessário para o crescimento da planta. Este elemento desempenha um papel vital em vários processos fisiológicos e metabólicos da planta (Zhao et al., 2014).

Acidothiobacillus spp, *Bacillus mucilaginosus*, *Burkholderia spp.* e *Paenibacillus spp* (Liu et al., 2012) são algumas bactérias que demonstraram aptidão para a solubilização K.

Já nos mecanismos indiretos, a promoção de crescimento é considerada quando a planta está sendo infectada por um patógeno (Mariano et al., 2004) e as BPCVs agem na produção de agentes de biocontrole (Glick 2012), podendo ajudar no controle de fitopatógenos por meio de antagonismo direto contra patógenos potenciais, por competição por espaço e nutrientes, ou mesmo controle de estresses abióticos (Tjamos et al., 2005; Beneduzi et al., 2012; Gomes et al., 2016.).

Alguns microrganismos conseguem através da ação de competição por espaço/nutrientes, secretarem algumas substâncias que pode interferir no desenvolvimento de outro microrganismo patógeno, inibindo o seu crescimento. A bactéria *Bacillus subtilis* por exemplo, é capaz de produzir compostos voláteis que podem inibir o crescimento de fungos de solo causadores de doenças de plantas, como acontece com espécies de *Fusarium* (Braga Junior et al., 2017).

2.1.3 Gênero *Trichoderma*, aspectos gerais e o uso na agricultura

Trichoderma spp. são fungos de ocorrência natural nos solos, especialmente os orgânicos, podendo viver saprofiticamente ou parasitando outros fungos. São fungos mitospóricos, agrupados na ordem Moniliales, família Moniliaceae. Produzindo conídios em abundância a partir de células conidiogênicas determinadas como fialídicas, estas células originadas de estruturas denominadas

conidióforos que são formadas diretamente das hifas vegetativas. Em seu estado teleomorfo, quando conhecido, pertencem à ordem Hypocreales (MELO, AZEVEDO, 1991; SAMUELS, 2006).

Fungos do gênero *Trichoderma* apresentam vida livre, são classificados na sub-divisão Deuteromycotina, considerados importantes para inoculação em culturas agrícolas e estão entre os agentes de biocontrole e biofertilizantes mais estudados no mundo (Chagas et al., 2018; Monte et al., 2019). São de fácil cultivo, por ser encontrado facilmente em diversos ambientes, possuem rápido crescimento em diferentes tipos de substratos, não são patogênicos ao homem e a plantas superiores (Mertz et al., 2009; Hermosa et al., 2013; Woo et al., 2014).

Uma característica que se destaca nesse gênero é a capacidade de se associar às raízes de plantas. Esta simbiose ocorre por mecanismos similares àqueles de fungos micorrízicos (Benítez et al., 2004). Essa interação se inicia com a colonização da superfície externa das raízes, e pode ser restrita ou ocorrer por todo o rizoplane, seguida da produção de celulasas (Ahmad & Baker, 1987) e da invasão da primeira ou da segunda camada de células da epiderme pelas hifas, com a produção de hidrofobinas, que são proteínas que permitem a adesão a superfícies hidrofóbicas (Kershaw, Talbot, 1998).

Possuem a capacidade de controlar a ação de patógenos das sementes, os quais sobrevivem no solo causando podridão, morte das plântulas e tombamento; protegem as partes subterrâneas das plantas contra ação de patógenos; melhora a taxa de germinação e o vigor das sementes; melhoram a absorção de nutrientes; promovem o crescimento e aumentam o rendimento das plantas (Carvalho Filho, 2008; Machado et al., 2012; Monte et al., 2019; Junior et al., 2019).

Algumas espécies pertencentes ao gênero *Trichoderma* tem efeito comprovado, como o *Trichoderma harzianum* na promoção de crescimento vegetal, solubilização de micro e macro nutrientes como Cu, Fe, Zn, Mn, Ca, P, combate a patógenos, síntese de hormônios como o ácido indolacético e colonização rizosférica (Carvalho Filho et al., 2008; Saito et al., 2009; Li et al., 2015). A espécie *Trichoderma asperelloides*, coloniza a rizosfera, combate a fitopatógenos, induz resistência ao stress biótico e abiótico, síntese de hormônios ácido indolacético (AIA), ácido abscísico (ABA), ácido giberélico (GA), solubilização de macro e micronutrientes como Cu, Fe, Mn, Ca, P (Brotman et al., 2013; Gupta et al., 2014; Chagas et al., 2017). A espécie *Trichoderma*

longibrachiatum combate fitopatógenos e é capaz de resistir ao stress em altas temperaturas (BATTAGLIA et al., 2013).

A estimulação do crescimento nas plantas pela aplicação de *Trichoderma* está relacionada ao controle dos microrganismos patogênicos presentes no solo (Machado et al., 2012), a produção de fitohormônios e ao aumento da disponibilidade e maior eficiência no uso de alguns nutrientes pelas plantas (Azarmi; Hajieghrari; Giglou, 2011; Nieto-Jacobo et al., 2017) Os efeitos positivos no crescimento e desenvolvimento de plantas associadas à espécies de *Trichoderma* já foram demonstrados em milho (Björkman et al., 1994), soja (Chagas Junior et al., 2019), tomate (Azarmi; Hajieghrari; Giglou, 2011), *Eucalyptus* sp.(Fortes et al., 2007) e *Pinus radiata* (Chávez; Pereira; Machuca, 2014).

Para um manejo mais sustentável das culturas agrícolas, os tratamentos culturais, como a utilização de adubos e defensivos agrícolas, devem ser conduzidos utilizando os princípios do manejo integrado, sendo uma das estratégias, a adoção do controle biológico e dos fungos promotores de crescimento, como os pertencentes ao gênero *Trichoderma* (Silva et al., 2019).

A influência de microrganismos sobre o desenvolvimento das plantas é bem conhecida, incluindo os efeitos benéficos na germinação de sementes, emergência de plântulas, crescimento e produtividade. A utilização de promotores de crescimento de plantas para o aumento da produção é, provavelmente, uma das táticas mais importantes atualmente, isto se deve à demanda emergente para a diminuição da dependência de fertilizantes minerais e da necessidade para o desenvolvimento de uma produção sustentável (Machado et al., 2012). A produção de inoculantes de baixo custo com microrganismos promotores de crescimento de plantas é uma alternativa para diminuir os riscos ambientais causados pela utilização inadequada de agrotóxicos. Os promotores de crescimento das plantas também contribuem para aumentar a produção, tornar o produto mais competitivo e, diminuir os custos para o produtor (Machado et al., 2012).

Atualmente, fungos do gênero *Trichoderma* são de grande importância econômica para a agricultura, uma vez que são capazes de atuarem como agentes de controle de doenças de várias plantas cultivadas, promotores de crescimento e indutores de resistência de plantas a doenças (Fortes et al., 2007; Holmes et al., 2004; Shores; Harman; Mastouri, 2010; Thonar et al., 2017). Eles atuam através

de diversos mecanismos, tais como antibiose, produção de enzimas degradadoras de parede celular, competição por nutrientes e micoparasitismo resultando em efeitos benéficos para as plantas (Harman, 2006; Shoresh; Harman; Mastouri, 2010).

2.1.4 Inoculantes mistos: Do Laboratório para o Campo

Os inoculantes são definidos por Russo e Berlyn (1990) como produtos que, quando aplicados nas plantas, reduzem a necessidade de fertilizantes e aumentam a produtividade e a resistência destas ao estresse hídrico e climático. Casillas et al. (1986) e Zhang e Schmidt (2000) afirmam que essas substâncias são eficientes quando aplicadas em pequenas concentrações, favorecendo o bom desempenho dos processos vitais da planta e permitindo, assim, a obtenção de maiores colheitas e produtos de melhor qualidade.

Entre os principais microrganismos utilizados para a produção de inoculantes merece evidência aqueles do tipo “multifuncionais”, tanto rizosféricos quanto endofíticos. Esta multifuncionalidade está relacionada à capacidade de produzir enzimas, fito-hormônios e substâncias que favorecem o incremento e proteção das plantas (Pieterse et al., 2012). Microrganismos multifuncionais possuem características de biofertilização e bioestimulantes, como a fixação de N e solubilização de fosfato pela produção de ácidos orgânicos e de enzimas da classe das fosfatases, entre elas as fitases (Oliveira et al., 2009; Jorguera et al., 2011). É desejável que este grupo abranja também a produção de enzimas hidrolíticas, como celulasas, xilanases, amilases, pectinases, lipases e proteases (Bull et al., 2002), sideróforos, fitoestimulantes (fitohormônios) e outras características associadas ao biocontrole (Malusà et al., 2016).

Há evidências de que o uso de inoculantes à base de microrganismos promotores do crescimento vegetal (MPCV) podem substituir, total ou parcialmente, o uso de fertilizante nitrogenado em cana-de-açúcar. Pereira et al. (2013) constataram que algumas variedades, quando inoculadas, chegam a acumular mais matéria seca do que em tratamentos com uso de fertilizante nitrogenado.

A elevação nos preços dos insumos agrícolas, dentre eles os fertilizantes minerais, aumentou a procura por fontes alternativas de nutrientes (Vidigal et al., 2010).

O uso em conjunto das bactérias diazotróficas endofíticas com ácidos húmicos vem sendo utilizado em diferentes culturas e contexto, pois a combinação promove o crescimento e desenvolvimento das plantas uma vez que os AH promovem o maior enraizamento (aberturas naturais para a infecção) e uma superfície irregular que favorece a ancoragem de bactérias e formação de biofilmes aumentando significativamente a colonização das plantas hospedeiras. As bactérias em maior número no hospedeiro promovem o crescimento pela fixação biológica de N e outros efeitos anteriormente considerados (Marques et al., 2008; Olivares et al., 2015).

A aplicação via foliar de bactérias diazotróficas endofíticas e substâncias húmicas promoveu um aumento de 65% na produção de grãos de milho comparado com o controle em condições de campo (Canellas et al., 2013). Estes resultados mostram um uso promissor de substâncias húmicas para melhorar o benefício da inoculação diazotrófica endofítica.

Com microtoletes de cana-de-açúcar, o uso isolado e combinado da bactéria com o AH promoveu um aumento significativo na área radicular, indicando que a presença de AH em conjunto com bactérias não é prejudicial aos estímulos causados pelas bactérias isoladamente (Marques et al., 2008). Pesquisas relacionadas às aplicações práticas de MPCV têm se destacado na medida em que já existem produtos comerciais à base desses microrganismos em vários países.

Tabela 1, Exemplos de MPCV usados como inoculantes ou cultura bacteriana de diferentes espécies de plantas em experimentos de solo.

Planta	Condições experimentais	Microrganismo	Principais características dos MPCV	Resultados principais	Referências
Grão de bico	Campo: cultura líquida aplicada às sementes	<i>Pseudomonas jessenii</i> PS06, <i>Me sorhizobium ciceri</i> C-2/2	Fixação de N ₂ (C-2/2), solubilização de P (PS06)	Plantas inoculadas com C-2/2, em inoculação única ou dupla, produziram maior peso fresco, número de nódulos e teor de N na parte aérea, enquanto PS06 não teve efeito significativo no crescimento das plantas. No entanto, a co-inoculação foi classificada em maior rendimento de sementes e peso fresco dos nódulos.	Valverde et al. (2006)

Milho	Casa de vegetação: cultura líquida aplicada às sementes ou ao solo	<i>Burkholderia ambifaria</i> MCI 7	Sideróforo, atividade antifúngica	O método de inoculação influenciou o crescimento das plantas: a cultura líquida aplicada às sementes promoveu aumento no peso fresco da parte aérea como controle, enquanto a cultura líquida aplicada no solo reduziu acentuadamente o crescimento das plantas.	Ciccillo <i>et al.</i> (2002)
Ervilha	Campo: turfa em pó, inoculante granular e líquido aplicado a sementes ou solo	<i>Rhizobium leguminosarum</i> b v. <i>Viciae</i>	N ₂ -fixing	Os efeitos da formulação inoculante no número de nódulos, acúmulo de N e fixação de N ₂ foram: turfa granular em pó líquido = não inoculado. O inoculante aplicado no solo melhorou a nutrição de N da ervilha de campo em comparação com a inoculação aplicada com sementes, com ou sem N-uréia aplicada.	Clayton <i>et al.</i> (2004)
Arroz	Campo: inoculante de turfa aplicado ao solo e mudas	<i>Pseudomonas</i> spp., <i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. subtilis</i> , levedura do solo	Não descrito	A inoculação aumentou significativamente a produção de grãos e palha e a absorção total de N, bem como a qualidade dos grãos em termos de porcentagem de N. A inoculação foi capaz de economizar 43 kg N ha ⁻¹ , com um rendimento adicional de arroz de 270 kg ha ⁻¹ em duas estações chuvosas consecutivas no local experimental.	Cong <i>et al.</i> (2009)
Soja	Campo: inoculante granular e de turfa aplicado a sementes e sulcos	<i>Bacillus cereus</i> UW85 (granular) e <i>B. japonicum</i> (turf)	Não descrito	A inoculação com UW85 resultou em estímulos no peso seco da parte aérea, aumento da produção e conteúdo de N, mas o efeito foi específico do local. A estimulação nos parâmetros de crescimento e N pelo tratamento com UW85 foi proporcionalmente maior na ausência de inoculação com <i>B. japonicum</i> do que na presença do inoculante rizóbio.	Bullied <i>et al.</i> (2002)

	Campo: inoculante líquido e aplicados em microtoletes	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> HRC 54 + ácidos húmicos	Fixação de N ₂ , promoção de crescimento	A inoculação microtoletes com isolados de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> HRC54 na presença de ácidos húmicos teve um estímulo no crescimento radicular com incremento de massa de 120%.	Marques <i>et al.</i> 2008
Cana-de-açúcar	CV e campo: cultura líquida aplicada a mudas	<i>B.vietnamiensis</i> MG43, <i>G. diazotrophicus</i> LMG7603, <i>H. seropedicae</i> LMG 6513	N ₂ -fixing	O aumento da biomassa devido à inoculação com MG43 atingiu 20% no campo. A inoculação de três cepas foi menos eficaz que a inoculação com uma única suspensão MG43.	Govindarajan <i>et al.</i> (2006)
	Campo: cultura líquida aplicada a estacas de caule	<i>G. diazotrophicus</i> VI27	Fixação N ₂ , sideróforo, IAA, solubilização de P	A cepa apresentou um aumento significativo no número de séries germinadas, na quantidade de sólidos solúveis e no rendimento de caldo de cana comparado ao controle.	Beneduzi <i>et al.</i> (2013)
Trigo	CV: cultura líquida aplicada ao solo	<i>B. subtilis</i> SU47, <i>Art hrobacter</i> sp. SU18	IAA, solubilizante de P	O teor de sódio foi reduzido sob condições de co-inoculação, mas não após a inoculação única com a cepa ou no controle. Plantas cultivadas sob diferentes regimes de salinidade e co-inoculação de PGPR mostraram aumento da biomassa seca e açúcares solúveis totais.	Upadhyay <i>et al.</i> (2012)
Tomate	CV: cultura aplicada na semente	<i>Azospirillum</i> <i>brasileense</i>	Fixação N ₂	Esta interrelação tomateiro com <i>Azospirillum</i> <i>brasileense</i> proporcionou maiores ganhos de massa seca, volume e comprimento de raiz maior diâmetro de caule, altura, índice SPAD e maior produção por planta.	Lima <i>et al.</i> (2018)

Um dos principais gargalos para o uso de MPCV como inoculantes em larga escala é a transferência dos resultados gerados em laboratório para a escala industrial e campo.

Dentro deste contexto de busca por novos microrganismos e inoculantes, a primeira etapa consiste no isolamento, seleção, identificação e avaliação dos microrganismos com características de promoção de crescimento de plantas em laboratório. Outras características devem ser avaliadas, como a taxa de sobrevivência, adaptação e multiplicação dos microrganismos na rizosfera (competência rizosférica) e a capacidade de colonização e infecção das plantas hospedeiras (competência endofítica) em testes de casa de vegetação e de campo (Sathya et al., 2016).

A etapa seguinte envolve uma avaliação criteriosa sobre a taxa de sobrevivência dos microrganismos no solo, adaptação e multiplicação na rizosfera, seguidas da infecção e colonização da planta hospedeira (Sathya et al., 2016). No solo, a estirpe(s) deve manter as suas propriedades durante o armazenamento e ser tolerante a fatores de estresse, tais como acidez, dessecação, altas temperaturas e agroquímicos.

Além disso, o veículo utilizado para inocular uma estirpe deve proporcionar uma boa proteção para células bacterianas, proporcionando a manutenção das células viáveis no solo até o período em que surgirem as raízes (Sahu; Brahma Prakash, 2016).

Vários estudos têm relatado que existem diferenças intrínsecas entre os microrganismos testados quanto ao melhor veículo de transporte do inóculo, em termos de sobrevivência e viabilidade celular. Ou seja, o melhor tipo de veículo para uma bactéria não é necessariamente o melhor para o outro (Silva et al., 2012).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Localização dos experimentos

Os ensaios foram conduzidos no Núcleo de Desenvolvimento de Insumos Biológicos para Agricultura (NUDIBA), e em casa de vegetação, e na Unidade de Apoio à Pesquisa do Centro de Bociência e Biotecnologia da Universidade Estadual Norte Fluminense (UENF), Campos dos Goytacazes-RJ. O clima da região Norte e Noroeste Fluminense é classificado como do tipo Aw de Köppen, tropical quente e úmido, com período seco no inverno, chuvoso no verão e precipitação anual em torno de 1112 mm.

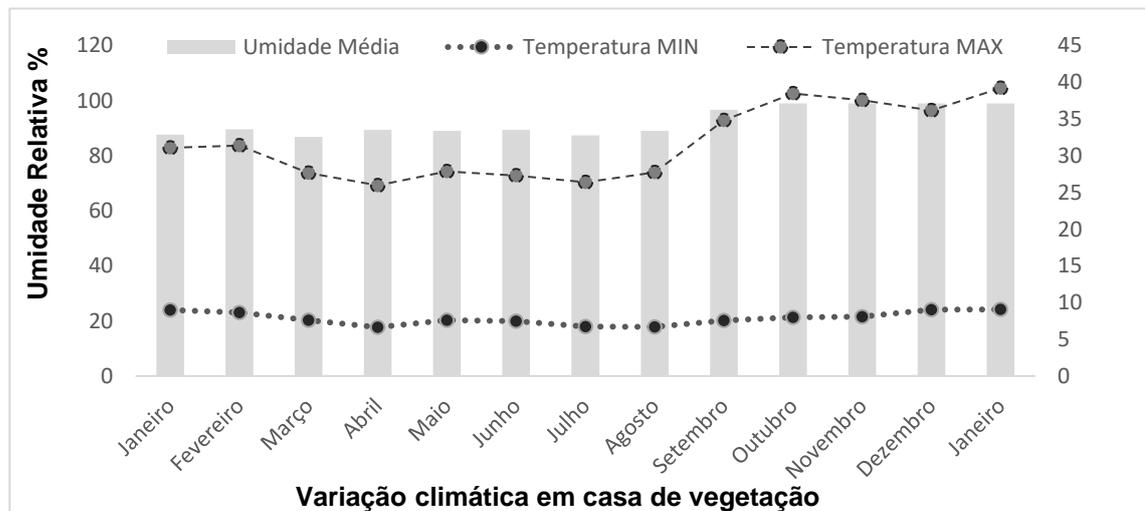


Figura 1. Dados climáticos do período experimental (janeiro de 2019 a janeiro de 2020). Campos dos Goytacazes, RJ.

3.1.1 Caracterização química do substrato

O substrato utilizado para compor as unidades experimentais e a produção de mudas foi Basaplant® Hortaliças em tubetes que possuíam diâmetro na parte superior de 40mm, 140mm de altura e 120mL. Foi realizado uma análise química do solo que revelou a seguinte composição:

Tabela 2: Composição do substrato Basaplant® Hortaliças utilizados nos ensaios I e II de promoção de crescimento.

Substrato Basaplant®	N	P	K	Ca	Mg	Al	H+Al	Na	S-SO ₄	Fe	Cu	Zn	Mn	B	CTC
	g/kg	mg/dm ₃	---	---	mmolc/dm ³	---	---	---	---	---	mg/dm ³	---	---	---	mmolc/dm ₃
pH															
4,3															
	0,028	266	12,6	12,2	41,0	7,6	151,8	37	240	40,2	0,57	10,5	37,6	0,65	331

*Extrator Carolina do Norte

3.1.1 Microrganismos selecionados e métodos de cultivo

Foram selecionados seis isolados bacterianos (*Herbaspirillum seropedicae* HRC54; *Serratia marcescens* 22G1; *Paraburkholderia silvatlantica* 101; *Paraburkholderia* sp.103; *Bacillus safensis* 77-B1; *Bacillus safensis* J1.1-B2) e um isolado fúngico (*Trichoderma longibrachiatum* T476) isolado de um vermicomposto proveniente da coleção do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (LBCT) da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF) para montagem do ensaio I de promoção de crescimento. Logo após, foi selecionado apenas dois isolados bacterianos e o isolado T476 para realização do consórcio microbiano. Para crescimento e manutenção dos isolados bacterianos foram utilizados meios de cultura líquido (8 g de caldo nutritivo, NB), e sólido (8 g de NB e 15 g de ágar). Em meio líquido, o crescimento foi sob agitação a 180 rpm constante em um agitador orbital por 48hs a 30 °C. Para o meio sólido em plaqueamento foram feitas estrias das culturas e incubados por 24hs a 30°C. Já o isolado fúngico, foi cultivado em meio batata-dextrose-ágar (BDA) por sete dias e armazenado em B.O.D. a 28 ±2°C com fotoperíodo de 12 horas sob luz branca fluorescente. A concentração final do isolado bacteriano foi ajustada para 10⁹ UFC⁻¹ por ml usando caldo nutritivo NB. Os esporos do isolado fúngico T476 foram coletados a partir de culturas de placas

BDA com 7 dias de idade e a concentração final de esporos foi ajustada para 10^7 UFC⁻¹ por ml com a utilização do software calibra.

3.1.2 Ensaio de compatibilidade fungo-bactéria

O isolado fúngico (T476) foi crescido separadamente em placas de Petri contendo meio de cultura BDA por sete dias em B.O.D. a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 12 horas sob luz branca fluorescente. Já as bactérias foram crescidas em caldo nutritivo líquido (NB – 8 g/L) durante 48 h a 30°C , contendo na sua composição 1,0 g extrato de carne; 2,0 g extrato de levedura; 5,0 g peptona bacteriológica; 5,0 g cloreto de sódio; que serão dissolvidos em 1 L de água destilada, esterilizada e autoclavada a 120°C , por 20 minutos.

Para os ensaios *in vitro* de compatibilidade foram inoculados no centro das placas de Petri contendo meio BDA discos de 5 mm cortados no bordo das colônias dos fungos purificados. Em cada extremidade foram inoculadas alíquotas de 20 μL das bactérias e, em seguida, as placas foram incubadas a 28°C durante sete dias. Após esse período foi avaliada a formação da zona de compatibilidade ou efeito de inibição do fungo sobre o crescimento das bactérias. Os testes foram realizados em triplicata e a compatibilidade entre os microrganismos foi classificada de acordo com o crescimento do fungo sobre a bactéria em: alta, média e baixa. Quando o fungo ultrapassa totalmente a superfície da bactéria deve-se considerar alta compatibilidade (C1); quando as hifas tocam as superfícies das colônias bacterianas sem cobri-las, de média compatibilidade (C1/2) e considerou-se baixa compatibilidade (C2) no caso de o fungo não tocar as bordas das colônias bacterianas.

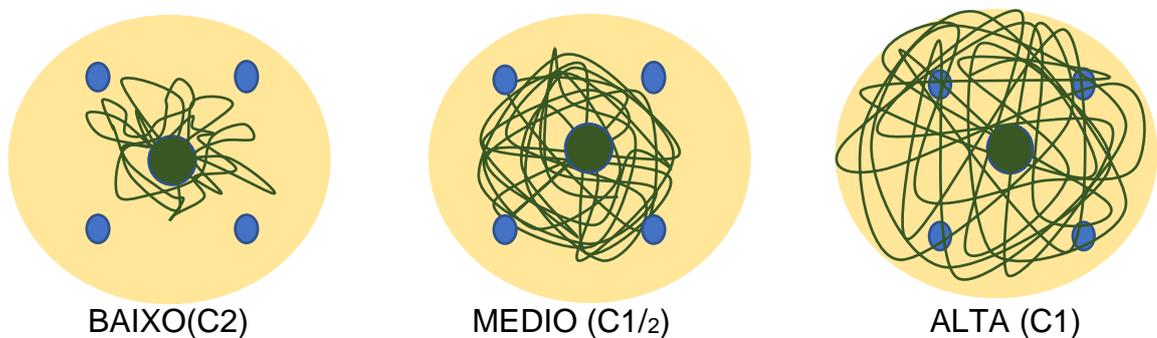


Figura 3. ilustração da compatibilidade dos microrganismos (bactéria e fungo), alta compatibilidade(C1); média c (C1/2) e baixa (C2).

3.1.3 Caracterização dos tratamentos e Cultivo das plantas – Ensaio I

Foram consideradas as seguintes fontes de variação para o ensaio I de promoção de crescimento: H₂O controle absoluto, meio de cultivo Nb, HRC54-*Herbaspirillum seropedicae*, 22GI-*Serratia marcescens*, 101-*Paraburkholderia silvatlantica*, 103-*Paraburkholderia* sp., B1- *Bacillus safensis* 77, B2- *Bacillus safensis* J1.1, HRC54- *Herbaspirillum seropedicae* + substrato autoclavado, 22GI-*Serratia marcescens* + substrato autoclavado, 101-*Paraburkholderia silvatlantica* + substrato autoclavado, 103-*Paraburkholderia* sp + substrato autoclavado, B1- *Bacillus safensis* 77 + substrato autoclavado, B2- *Bacillus safensis* J1.1 + substrato autoclavado, HRC54- *Herbaspirillum seropedicae* + *Trichoderma longibrachiatum* T476, 22GI-*Serratia marcescens* + *Trichoderma longibrachiatum* T476, 101-*Paraburkholderia silvatlantica* + *Trichoderma longibrachiatum* T476, 103-*Paraburkholderia* sp + *Trichoderma longibrachiatum* T476, B1- *Bacillus safensis* 77 + *Trichoderma longibrachiatum* T476, B2- *Bacillus safensis* J1.1 + *Trichoderma longibrachiatum* T476, HRC54-*Herbaspirillum seropedicae* + *Trichoderma longibrachiatum* T476 + substrato autoclavado, 22GI-*Serratia marcescens* + *Trichoderma longibrachiatum* T476 + substrato autoclavado, 101-*Paraburkholderia silvatlantica* + *Trichoderma longibrachiatum* T476 + substrato autoclavado, 103-*Paraburkholderia* sp + *Trichoderma longibrachiatum* T476 + substrato autoclavado, B1- *Bacillus safensis* 77 + *Trichoderma longibrachiatum* T476 + substrato autoclavado, B2- *Bacillus safensis* J1.1+ *Trichoderma longibrachiatum* T476 + substrato autoclavado.

Tabela 3: Tratamentos utilizados no ensaio I da promoção de crescimento.

Tratamentos	Caracterização do tratamento	Meios de aplicação	Épocas de aplicação	Substrato
H ₂ O	Controle absoluto	TS	ID	N.A
MC	Controle alternativo	TS	ID	N.A
HRC54	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> HRC54	TS	ID	N.A
22GI	<i>Serratia marcescens</i> 22GI	TS	ID	N.A
101	<i>Paraburkholderia silvatlantica</i> 101	TS	ID	N.A
103	<i>Paraburkholderia</i> sp.103	TS	ID	N.A
B1	<i>Bacillus safensis</i> 77-B1	TS	ID	N.A
B2	<i>Bacillus safensis</i> J1.1-B2	TS	ID	S.A
HRC54 + SA	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	TS	ID	S.A
22GI + SA	<i>Serratia marcescens</i> 22GI	TS	ID	S.A
101 + SA	<i>Paraburkholderia silvatlantica</i> 101	TS	ID	S.A
103 + SA	<i>Paraburkholderia</i> sp.103	TS	ID	S.A
B1 + SA	<i>Bacillus safensis</i> 77-B1	TS	ID	S.A
B2 + SA	<i>Bacillus safensis</i> J1.1-B2	TS	ID	S.A
HRC54 + T476	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> + <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	TS	ID	N.A
22GI + T476	<i>Serratia marcescens</i> 22GI + <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	TS	ID	N.A
101 +T476	<i>Paraburkholderia silvatlantica</i> 101 + <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	TS	ID	N.A
103 +T476	<i>Paraburkholderia</i> sp.103 + <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	TS	ID	N.A
B1 +T476	<i>Bacillus safensis</i> 77-B1 + <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	TS	ID	N. A
B2 +T476	<i>Bacillus safensis</i> J1.1-B2 + <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	TS	ID	N.A
HRC54 + T476 + SA	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> + <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	TS	ID	N.A
22GI + T476 + SA	<i>Serratia marcescens</i> 22GI + <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	TS	ID	S.A
101 + T476 + SA	<i>Paraburkholderia silvatlantica</i> 101 + <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	TS	ID	S.A
103 + T476 + SA	<i>Paraburkholderia</i> sp.103 + <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	TS	ID	S.A
B1 + T476 + SA	<i>Bacillus safensis</i> 77-B1 + <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	TS	ID	S.A
B2 + T476 + SA	<i>Bacillus safensis</i> J1.1-B2 + <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	TS	ID	S.A

H₂O-controle; MC- Meio de cultivo NB; - *Herbaspirillum seropedicae* HRC54; 22GI- *Serratia marcescens* 22GI; 101- *Paraburkholderia silvatlantica* 101; 103- HRC54 *Paraburkholderia* sp.103; B1- *Bacillus safensis* 77-B1; B2- *Bacillus safensis* J1.1-B2; *Trichoderma longibrachiatum* T476. SA – Substrato autoclavado, N.A – substrato não autoclavado; TS- Tratamento na semente; ID – Inoculação no dia do plantio

As sementes de tomate cv. Santa Cruz foram microbiolizadas com suspensão dos isolados solteiros ou combinados (apenas as duas bactérias) e em consórcio com o isolado fúngico pela imersão das sementes nas suspensões líquidas. A realização da microbiolização das sementes de tomate foi mediante imersão das sementes nos tratamentos acima, para os isolados bacterianos a (concentração de 2×10^9 UFC/ml) e para o isolado fúngico (2×10^7 UFC/g) por uma hora, sob agitação de 180 rpm. As sementes foram deixadas secar em temperatura ambiente (25°C) durante uma hora. Logo após, as sementes foram plantadas em tubetes contendo apenas o substrato comercial Basaplant® com a variação de estar ou não autoclavado.

Os isolados bacterianos foram cultivados por 24h antes da microbiolização em meio de cultura NB, em frascos, sob agitação constante a 180 rpm e a 28°C , já o isolado fúngico foi colocado para crescer por 7 dias.

As mudas foram coletadas aos 30 dias após a semeadura para determinação dos parâmetros agrônômicos. Diante dos resultados das análises do ensaio I foram selecionados dois isolados bacterianos (B2 e 22GI) que foram combinados entre si e com o isolado fúngico (T476) que terá diferentes formas de inoculação. Uma inoculação direta ao solo com o arroz triturado adicionando 3g kg^{-1} de substrato (10^7 conídios/g de arroz) do fungo *Trichoderma longibrachiatum*, e pelo método de microbiolização das sementes pela suspensão (10^7 UFC/ml). O isolado T476 foi inoculado em dois tempos distintos: 7 dias antes do plantio e no dia do plantio (inoculação direta no substrato) e durante a microbiolização da semente.

O delineamento experimental para ensaio I de promoção de crescimento ocorreu em blocos casualizados DBC, consistindo em 26 tratamentos com cinco repetições de 2 plantas.

3.1.4 Caracterização dos tratamentos e Cultivo das plantas – Ensaio II

Foram consideradas as seguintes fontes de variação para o ensaio II de promoção de crescimento: H₂O controle absoluto, meio de cultivo Nb, *Trichoderma longibrachiatum* T476, B2- *Bacillus safensis* J1.1 + 22GI-*Serratia marcescens*, B2- *Bacillus safensis* J1.1 + 22GI-*Serratia marcescens* + *Trichoderma longibrachiatum* T476, B2- *Bacillus safensis* J1.1 + 22GI-*Serratia marcescens* + *Trichoderma longibrachiatum* T476 + FA7, B2- *Bacillus safensis* J1.1 + 22GI-*Serratia*

marcescens + *Trichoderma longibrachiatum* T476 + FS7, B2- *Bacillus safensis* J1.1 + 22GI-*Serratia marcescens* + *Trichoderma longibrachiatum* T476 + FAD.

As sementes de tomate cv. Santa Cruz foram microbiolizadas com suspensão dos isolados solteiros ou combinados (apenas as duas bactérias) e em consórcio com o isolado fúngico pela imersão das sementes nas suspensões líquidas. A realização da microbiolização das sementes de tomate, mediante imersão das sementes nos tratamentos acima, para os isolados bacterianos a (concentração de 2×10^9 UFC/ml) e para o isolado fúngico (2×10^7 UFC/g) por uma hora, sob agitação de 180 rpm. As sementes foram deixadas secar a temperatura ambiente (25° C) durante uma hora. Logo após, as sementes foram plantadas em tubetes contendo apenas o substrato comercial Basaplant®.

Tabela 4: Tratamentos utilizados no ensaio II da promoção de crescimento. H₂O- controle; MC- Meio de cultivo NB; 22GI- *Serratia marcescens* 22GI; B2- *Bacillus safensis* J1.1-B2; *Trichoderma longibrachiatum* T476.

Tratamentos	Caracterização do tratamento	Meios de aplicação	Épocas de aplicação	Tipos de Inoculação
H ₂ O	Controle absoluto	TS	ID	--
MC	Controle alternativo	TS	ID	--
T476	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	TS	ID	IL
B2+22GI	<i>Bacillus safensis</i> J1.1 + 22GI- <i>Serratia marcescens</i>	TS	ID	IL
B2+22GI+T476	<i>Bacillus safensis</i> J1.1 + 22GI- <i>Serratia marcescens</i> + <i>Trichoderma longibrachiatum</i> F476	TS	ID	IL
B2+22+TA7	B2- <i>Bacillus safensis</i> J1.1 + 22GI- <i>Serratia marcescens</i> + <i>Trichoderma longibrachiatum</i> F476 + FA7	TS+A7	ID+I7A	IL+A7
B2+22+TS7	<i>Bacillus safensis</i> J1.1 + 22GI- <i>Serratia marcescens</i> + <i>Trichoderma longibrachiatum</i> F476 + FS7	TS+AS7	ID+I7A	IL+S7
B2+22+TAD	- <i>Bacillus safensis</i> J1.1 + 22GI- <i>Serratia marcescens</i> + <i>Trichoderma longibrachiatum</i> F476 + FAD.	TS+ASD	ID+I7A	IL+AD

TS: Tratamento de sementes (Microbiolização das sementes), TS+A7: Tratamento de sementes + Aplicação no substrato 7 dias antes do plantio, TS+AS7: Tratamento de sementes + Aplicação no substrato 7 dias antes

do plantio, TS+ASD: Tratamento de sementes + Aplicação no substrato no dia, ID: Inoculação no dia do plantio, ID+I7A: Inoculação no dia do plantio + Inoculação no substrato 7 dias antes do plantio, IL: Inoculo + líquido, IL+A7: Inoculo líquido + Inoculo arroz 7 dias antes no substrato, IL+S7: Inoculo líquido + Inoculo líquido 7 dias antes no substrato, IL+AD: Inoculo líquido + Inoculo arroz no dia do plantio no substrato.

Os isolados bacterianos foram cultivados por 24h antes da microbiolização em meio de cultura NB, em frascos, sob agitação constante a 180 rpm e a 28°C, já o isolado fúngico foi colocado para crescer por 7 dias.

O isolado *Trichoderma longibrachiatum* T476 foi aplicado de três diferentes formas no ensaio II, a primeira através igualmente ao ensaio I pela microbiolização das sementes por suspensão dos esporos lavados da superfície dos grãos de arroz (10^7 UFC/ml), a segunda aplicação direta da suspensão de esporos aplica diretamente ao solo sete dias antes do plantio das sementes e a terceira utilizando o arroz como veículo e aplicado 7 dias antes do plantio das sementes, ambas as sementes, tanto para o segundo quanto para o terceiro método, foram microbiolizadas no dia do plantio. Utilizou-se o arroz integral como veículo de inoculo, previamente esterilizado três vezes por 15 min a 121 °C no intervalo de 24 h para cada autoclavagem. Duas placas de BDA crescidas previamente com o *T. longibrachiatum* isolado T476 foram lavadas com 200 ml de água destilada esterilizada, obtendo, assim, esporos e micélios do fungo em suspensões, sendo inoculadas em 500 g do arroz em sacos de polietileno sob atmosfera estéril. Incubou-se o arroz por 7 dias a 28 °C. Foram feitas agitações do saco de arroz em intervalos de 24 h para o crescimento homogêneo da isolado T476. Após, porções de 3 g do arroz com aproximadamente 1×10^7 conídios/ml, ajustados em câmara de Neubauer com auxílio do *software* calibra, foram inoculadas com 3 ml das suspensões bacterianas (10^9 células. mL⁻¹) obtendo assim os inoculantes mistos. Foram semeadas as sementes conjuntamente com os inoculantes no substrato em tubetes de volume 280 cm³. Os controles receberam a mesma porção de arroz esterilizado sem a presença do isolado fúngico. As mudas foram coletadas aos 30 dias após a semeadura para determinação dos parâmetros agrônômicos, análises bioquímicas e microbiológicas.

O delineamento experimental para ensaio II de promoção de crescimento foi em blocos casualizado DBC, consistindo em 8 tratamentos com cinco repetições de 2 plantas.

3.1.5 Avaliação dos consórcios microbianos como promotoras de crescimento de plantas de tomate

A coleta de dados ocorreu aos 30 dias após a semeadura, onde foi avaliada parâmetros de crescimento vegetal, incluindo: a) *altura de planta*, expressa em cm, medida com régua milimetrada, a partir do coleto até a gema apical; b) *número de folhas*, avaliado pelo método visual c) *diâmetro do caule*, expresso em mm, medido na base do coleto, utilizando-se um paquímetro digital, com precisão de 0,01 mm; d) *comprimento da maior raiz*, expresso em cm, medida com régua milimetrada, a partir do coleto até a extremidade da maior raiz; e) *volume de raiz*, com o auxílio do programa WinRhizo (8); f) *massa fresca e massa seca da parte aérea e da raiz*, expressa em grama, pesada em balança com precisão de 0,001g, g) área foliar.

Para determinação da massa seca, o material vegetal foi conduzido à estufa com circulação forçada de ar à temperatura de 65°C até atingir peso constante; h) *massa seca total*, expressa em gramas, obtida pela soma das massas secas da parte aérea e da raiz. Calculou-se a razão entre a altura da muda e o diâmetro do colo (RAD), aos 30 dias após a semeadura (DAS), a razão entre a massa seca da parte aérea e do sistema radicular (RMS), e a razão entre a altura da muda e a massa seca da parte aérea.

O Índice de Qualidade de Dickson foi determinado em função da altura da parte aérea (H), do diâmetro do colo (DC), fitomassa seca total (PMST) que é dada pela soma da fitomassa seca da parte aérea (MSPA) e a fitomassa seca das raízes (PMSR), através da equação (Dickson et al., 1960): $IQD = [MST / (AP / DC) + MSA / MSR]$

A partir das medidas anteriores foram determinadas as seguintes variáveis de qualidade de mudas, como a relação entre a altura da parte aérea/diâmetro do coleto (RH/DC); altura da parte aérea/massa seca da parte aérea (RHPA/MSPA); massa seca da parte aérea/massa seca das raízes (RMSPA/MSR).

Avaliações fisiológicas:

Para a padronização das medições da clorofila serão feitas leituras na segunda folha desenvolvida de cima para baixo marcadas com fio de barbante, (estimado com auxílio de clorofilômetro SPAD). O valor SPAD utilizado será resultante da média de três leituras por planta em cinco plantas por tratamento no ensaio II.

3.2 Atividade microbiana no solo

A atividade microbiana foi identificada pela quantificação de fluoresceína obtida a partir da degradação do diacetato de fluoresceína (FDA) pelo micro-organismo presente no solo. O FDA foi dissolvido em acetona, para a obtenção da solução estoque de 1g/L. Para demonstração da atividade microbiana foram pesados 0.5g de solo de cada amostra, ao qual foram acrescentados 6 ml de tampão fosfato (TPO4) 50mM em pH 7.6 autoclavado e em seguida acrescentado 120µL da solução de FDA. A amostra foi incubada por 1h, em shaker rotativo 180rpm à 32°C ao abrigo da luz, em tubo Falcon 15mL. O controle negativo foi obtido a partir de 0.5g de solo autoclavado. Após este período, o material foi centrifugado a 5000 rpm por 6 min, filtrado e ao final uma alíquota de 200µL do sobrenadante foi retirado da amostra e distribuída em placas de 96 poços. A leitura foi realizada em espectrofotômetro Versa Max PLUS com absorvância de 492nm pelo programa Soft Max.

3.2.1 Contagem do Número Mais Provável (NMP) de bactérias diazotróficas endofíticas

A contagem das bactérias diazotróficas seguiu a metodologia descrita por (Döbereiner et al., 1995; Baldani et al., 1996). As amostras das raízes das plantas foram lavadas em água corrente e cortadas em pedaços de aproximadamente 10 cm. As frações foram pesadas (1g) e maceradas em 9 ml de solução salina e diluídas serialmente na mesma solução até 10^{-7} . Uma alíquota de 0,1 ml das suspensões 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} foi inoculada em cultura semissólido JNFb, em triplicatas (3 frascos por diluição). O meio de JNFb foi incubado a 30°C por 7 dias e após este período, foi realizada a contagem do número de bactérias presentes nas amostras pelo método do Número Mais Provável (NMP), utilizando a tabela de McCrady. O número de tubos positivos foi determinado pela presença de película subsuperficial característica, em forma de véu, no meio semissólido.

3.2.2 Quantificação dos isolados presentes nas raízes de tomate inoculados com bactérias diazotróficas e *Trichoderma longibrachiatum* T476

A fim de se quantificar as populações presentes nas raízes de tomate, se utilizou o método de diluição seriada. Os procedimentos seguiram a partir da coleta

do material do segundo ensaio de promoção de crescimento. As diluições foram realizadas com raízes lavadas em água corrente. Para as diferentes amostras de raízes foi pesado 1g da mesma e transferido para tubos de ensaio contendo 9mL de solução salina ($8,5 \text{ g.L}^{-1}$). A diluição seriada foi utilizada nas subamostras de todos os oito tratamentos. Após a diluição inicial (10^{-1}), os frascos contendo as raízes foram alocados em agitador orbital a 150 rpm 14 por 10 minutos. Em seguida, 1 ml das diluições foi transferido para tubos de ensaio contendo 9 ml de solução salina de mesma concentração com pipetas manuais, e alíquotas de 1ml foram transferidas para novos tubos de ensaios, obtendo assim diluições de 10^{-2} a 10^{-8} . Contudo, para as contagens das unidades formadoras de colônia (UFC por grama de solo) foram utilizadas as diluições de 10^{-4} a 10^{-8} . A partir das diluições de 10^{-4} e 10^{-8} , alíquotas de 100 μL das diferentes amostras diluídas foram semeadas no centro de placas de Petri contendo o meio de cultivo NB (Nutrient Broth) para bactérias e fungos.

3.2.3 Análises Bioquímicas Proteína, Lipídios e Carboidrato

3.2.3.1 Estimativa do Carboidrato Total

O método Anthron foi usado neste estudo para extração e estimativa de açúcares totais em amostras de folhas frescas (Yemm e Willis 1954). 0,5 g de folha fresca foi esmagada em 10 mL de $\text{D.H}_2\text{O}_2$. O processo de centrifugação de 5 minutos foi realizado a 3000 rpm. Para estimativa: 0,1 ml de sobrenadante foi misturado com 1 ml de fenol (80%) e a amostra foi incubada durante um intervalo de 10 minutos na incubadora, 5 ml concentrado - H_2SO_4 foi adicionado e a mistura foi novamente incubada durante uma hora. A densidade óptica da solução foi medida a 485nm.

3.2.3.2 Estimativa das Proteínas Totais

As proteínas totais das plantas foram medidas através de um método bem definido explicado por Bradford (1976). 0,1 g de amostra de folha foi homogeneizada em pilão e almofariz gelado, usando 5 ml de tampão de fosfato (pH = 7, Fosfato de potássio 0,1 M). Incubou-se o extrato no freezer e a seguir o

processo de centrifugação foi realizado por 20 minutos a 12.000 rpm. O volume final do sobrenadante foi feito até 5 ml com a ajuda de tampão, em seguida, adicionar 4,8 ml de tampão a 0,2 ml do extrato para diluição. Para estimativa das proteínas totais, 0,1 ml do extrato diluído foi colocado em um tubo de ensaio limpo e adicionado 5 ml do reagente de Bradford. A O.D foi então registrada em 595nm usando espectrofotômetro.

3.2.3.3 Estimativa de Lipídios Totais

O conteúdo total de lipídios foi medido de acordo com o método bem estabelecido de Van Handel (1985). Aproximadamente 0,2 g de amostra de folha foi moída em clorofórmio: metanol (2: 1 v / v). O tubo foi agitado vigorosamente até estar dissolvido e adicionado 0,8 ml de NaCl a 0,73%. Após a conclusão da reação, três camadas com compostos diferentes foram separadas. A camada inferior contém lipídios e foi coletada por meio de funil de separação. Adicionou-se 0,1 mL de ácido sulfúrico e a mistura foi agitada, em seguida a mistura foi aquecida a 100 °C por 10 minutos. Em seguida, Resfrie a amostra foi resfriada e adicionada 2,4 ml de reagente de vanalina. A absorbância foi registrada a 490nm após o aparecimento da cor rosa.

3.3 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), contrastes ortogonais e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Scott-Knott com 95% de confiança. Para análises do ensaio I e para o ensaio II foram aplicados contrastes ortogonais e o Tukey em 99% de confiança para as demais análises, utilizando o programa computacional SAS versão 9.0, Past 4 e Sigmaplot 12.5. Os dados foram organizados e submetidos aos testes de Shapiro-Wilk para normalidade dos dados e Bartlett para homogeneidade das variâncias dos tratamentos. Foram realizados Contrastos Ortogonais para verificação da diferença entre os tratamentos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Compatibilidade entre isolados bacterianos e fúngico

Foram realizadas seis combinações para avaliação de compatibilidade entre o fungo e as bactérias: T476 vs HRC54; T476 vs UENF-22GI; T476 vs 101; T476 vs 103; T476 vs B1 e T476 vs B2 e observada a compatibilidade do tipo (C1) obtendo uma alta compatibilidade do isolado fúngico com as bactérias. O fungo *T. longibrachiatum* apresentou uma alta compatibilidade (C1) com os 6 isolados bacterianos, respectivamente. As hifas do *T. longibrachiatum* cresceram e ultrapassaram as colônias bacterianas demonstrando alta compatibilidade entre os pares de microrganismos (Figura 4).

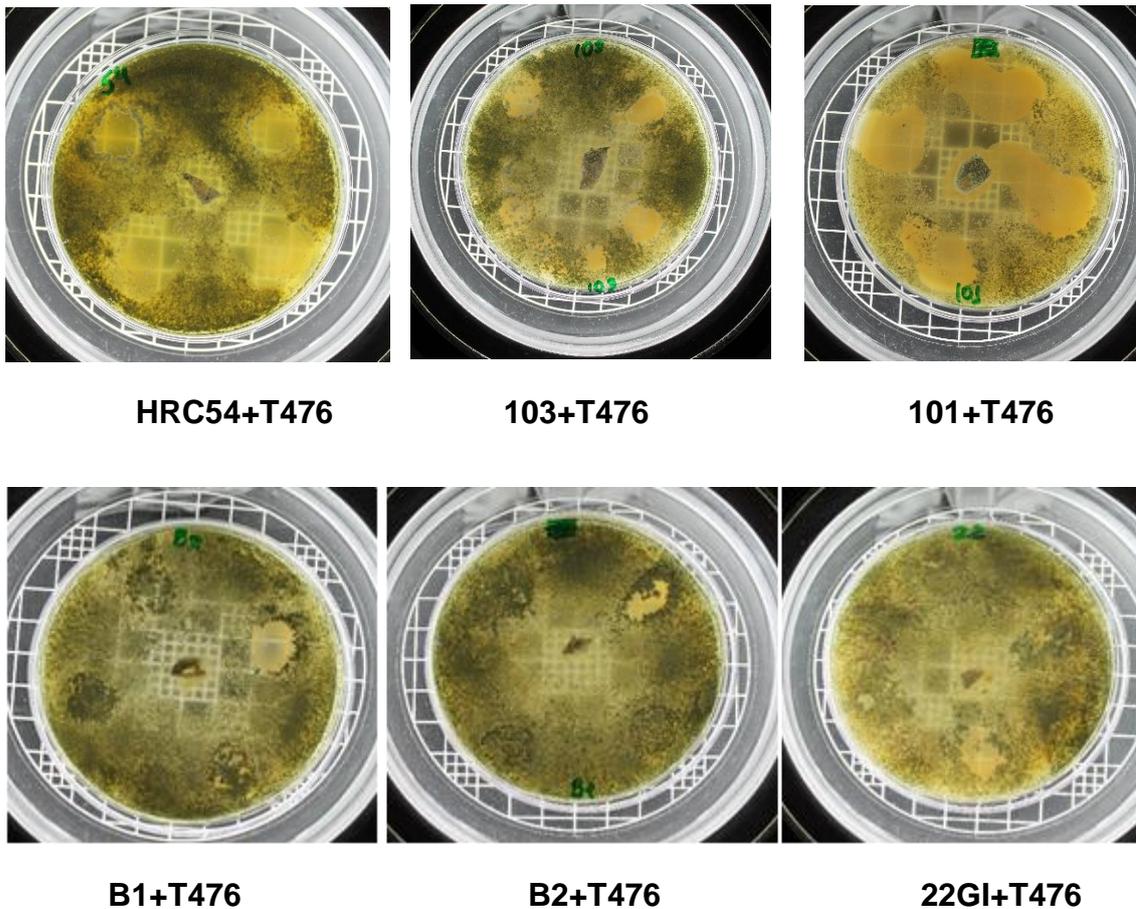
Reis et al (2020) relataram alta compatibilidade e interação entre *S. marcescens* cepa UENF-22GI e *T. longibrachiatum* cepa T476, observando o crescimento das hifas (h) foi visível com 1-d após a colocação do tampão de ágar nas lâminas de vidro, expandindo-se na direção da mancha bacteriana.

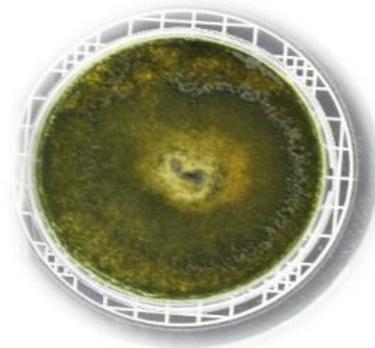
Vários organismos sobrevivem e interagem entre si nos diferentes solos e substratos sob a influência de fatores como teor de matéria orgânica, pH, macro e micronutrientes, umidade, textura, estrutura, micro e macroporosidade e trocas gasosas, que influenciam significativamente o crescimento dos diversos microrganismos presentes no solo. Apesar desses estudos in vitro não levarem em consideração esses fatores que podem alterar o comportamento desses

organismos quando em conjunto, os resultados observados são indicativos de compatibilidade no ambiente solo. Geralmente, espera-se que quando combinados a aplicação de antagonistas aumentaria o controle de patógenos e a promoção de crescimento de plantas (Meyer & Roberts, 2002; Thilgavathi et al., 2007).

O isolado fúngico T476 de *T. longibrachiatum* apresentou maior velocidade de crescimento, progredindo por toda a placa de petri em 72 h de incubação nas combinações (T476 + 22GI; T476 + B2. Resultados semelhantes foram encontrados por Ferreira et al. (2008), em que *Trichoderma sp.* e *P. chlamydosporia* não influenciaram o crescimento um do outro em testes de confronto direto. Portanto, foram selecionados os pares B2 + T476 e UENF-22 GI + T476 para os estudos subsequentes de promoção de crescimento (ensaio 2).

Após sete dias de interação, a adesão da bactéria na superfície do fungo da parede celular foi evidente pela formação de pequenos agregados e migração associada às hifas de crescimento da ponta (Figura 4).





T476

Figura 4. Placas de petri contendo meio BDA inoculadas com pares de microrganismos e incubadas por oito dias a 28 °C. Todas as combinações apresentando alta compatibilidade, (HRC54- *Herbaspirillum seropedicae* HRC54; 22GI- *Serratia marcescens* 22GI; 101- *Paraburkholderia silvatlantica* 101; 103- *Paraburkholderia* sp.103; B1- *Bacillus safensis* 77-B1; B2- *Bacillus safensis* J1.1-B2) e um isolado fúngico (T476 de *Trichoderma longibrachiatum*)

Em um estudo com inoculações consorciadas entre fungos e bactérias diazotróficas em plantas de trigo, Sala et al. (2007), observaram efeitos sinérgicos na colonização das raízes pelas bactérias, o que contribuiu positivamente na interação planta-bactéria.

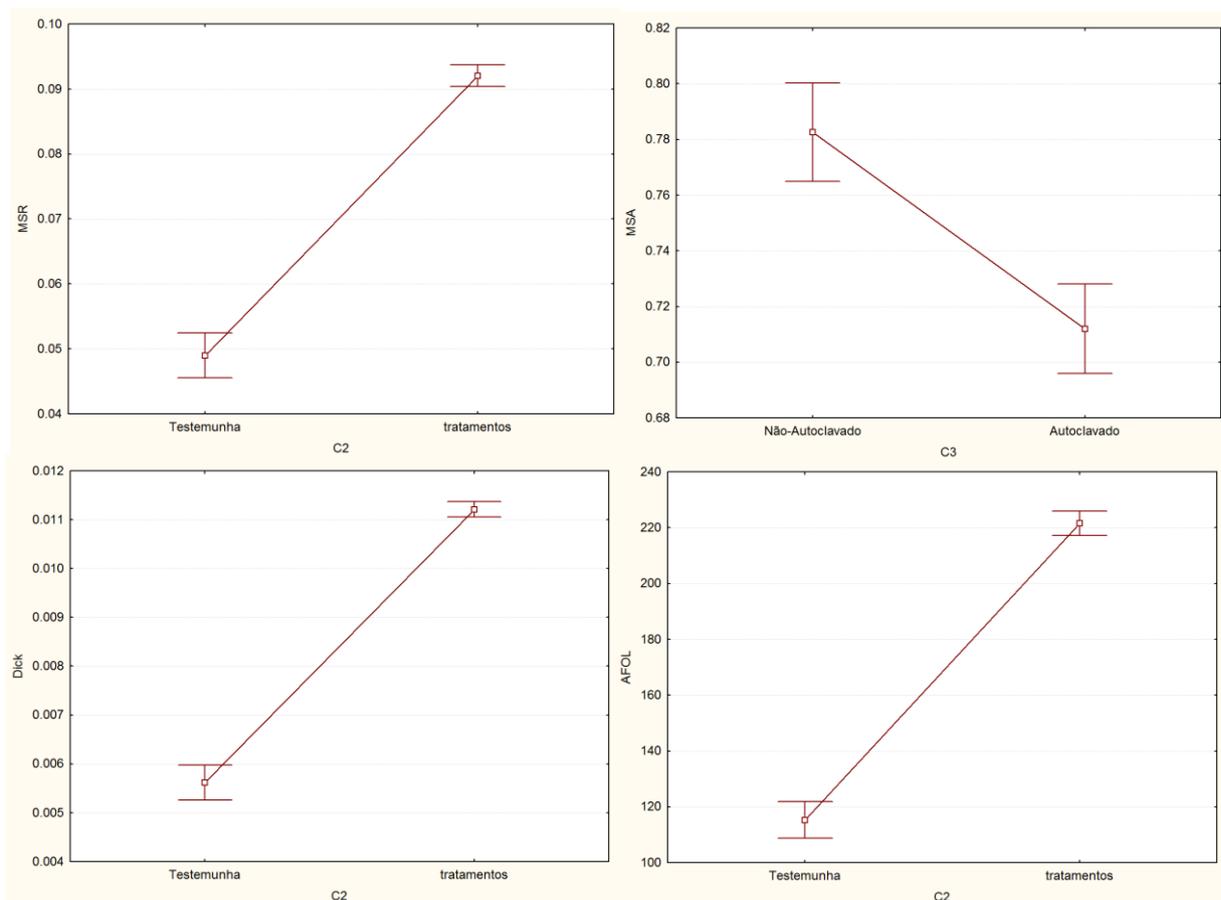
Para que outro produto de origem biológica seja aplicado em conjunto é necessário saber se estes são compatíveis. Testes in vitro, casa de vegetação e depois em campo são muito importantes para comprovar a eficiência de antagonistas combinados.

4.2 Resposta de crescimento de plantas de tomateiro inoculadas com diferentes combinações de isolados microbianos em casa de vegetal (ensaio I)

O efeito dos microrganismos isolados ou em consórcio resultou no crescimento e na morfologia das plantas, diferindo fortemente daqueles tratamentos não inoculados. A inoculação dos isolados microbianos em qualquer uma das cepas utilizadas nos ensaios aumentou o crescimento da planta, raiz, área foliar, número de folhas, matéria fresca e seca total e diâmetro do caule nas mudas de tomate.

Os contrastes C2, comparando os tratamentos inoculados com não inoculados, apresentaram diferença significativa para a área foliar, índice de qualidade de dickson e matéria seca da raiz nas plantas de tomate aos 30 dias de cultivo, demonstrando assim que os grupos testados neste contraste diferem significativamente entre si, evidenciando a diferença em diversos parâmetros em relação as testemunhas.

Nos mesmos contrastes estabelecido, o valor estimado para C2 demonstra que a média dos tratamentos que receberam a inoculação com os microrganismos promotores de crescimento diferem significativamente dos tratamentos que não receberam MPCV, sendo o grupo dos tratamentos que receberam a inoculação se mostraram mais desenvolvidos ao fim das avaliações, apresentando índices médios de dickson de 0,29 sendo superiores aos sugeridos na literatura, que sugere o valor de 0,21.



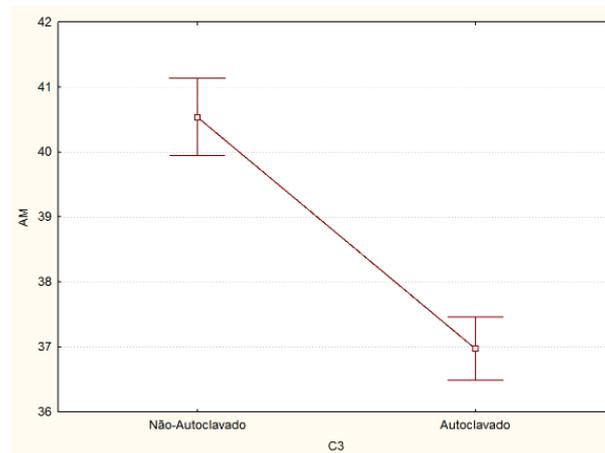


Figura 5. Gráficos de contraste ortogonais MSR – matéria seca da raiz C2, MAS – matéria seca aérea C3, Dick- índice de qualidade de Dickson C2, AFOL – área foliar C2, AM – altura da muda C3.

Comparando-se o fator substrato (autoclavado e não autoclavado), os resultados dos contrastes ortogonais para crescimento de plantas, indicaram que a média dos tratamentos constituídos pelos substratos não autoclavado foi estatisticamente superior ao uso do substrato autoclavado para as variáveis massa seca da raiz e altura das mudas (Tabela 12), o que pode ser observado também nos gráficos (Figura 5).

Para os contrastes C3, a utilização do substrato não autoclavado com a adição das sementes microbiolizadas mais 1 ml da solução dos MPCV apresentou maior estimativa para média de altura da muda e matéria seca da raiz (Figura 5), indicando que a inoculação separada ou em conjunto (bactéria +fungo) foi superior aos tratamentos com o substrato autoclavado, observando-se a capacidade dos microrganismos inseridos no meio em competir e se estabelecer, eliminando quaisquer tipo de competição com os microrganismos nativos, e se impondo como macros dentro do sistema (solo-planta-microrganismos). Assim, sua capacidade de sobrevivência aumenta quando colocados a fatores de estresses bióticos ou abióticos, preconizando assim maior sobrevivência no meio.

Para C2 e C3 observa-se que houve diferença significativa, demonstrando que a aplicação dos microrganismos promotores de crescimento vegetal de forma consorciada ou sozinha resultou em incrementos sobre os parâmetros de crescimento das plantas de tomate. Santos et al. (2013) e Borges (2018) observaram que a aplicação de bioestimulante, no tratamento de sementes na

cultura do milho, resultou em incrementos ao longo do tempo para as características fitotecnias.

Esse resultado sugere que os microrganismos aplicados na forma de microbiolização das sementes foram absorvidos e tiveram efeito benéfico tanto nutricional quanto hormonal e/ou fisiológico.

No teste de médias, utilizando Scott-Knott a 5% de significância, houve diferença estatística entre os tratamentos referente a todos os parâmetros de crescimento analisados.

Por sua vez, os tratamentos inoculados com o consórcio microbiano em especial os (B2+T476; 22GI+T476) tiveram aumentos expressivos com um incremento superior à 112% na altura da muda total, 161% na matéria seca total e 133% para o volume radicular em relação aos tratamentos controles (H2O; MC) (Figura 6).

As estirpes bacterianas e suas interações com a isolado *Trichoderma longibrachiatum* T476 apresentaram aumentos em todas as características vinculadas ao crescimento de mudas de tomate.

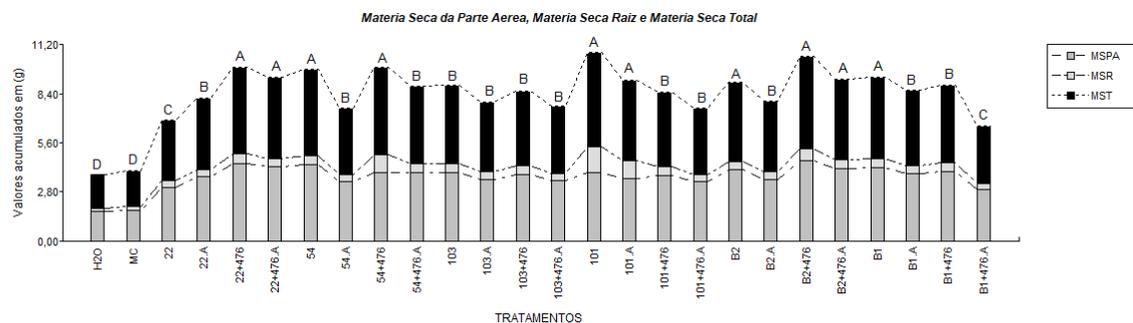


Figura 6: Produção de matéria seca da parte aérea MSPA, matéria seca da raiz MSR e matéria seca total MST de mudas de tomate aos 30 dias de cultivo em ambiente protegido.

O efeito dos microrganismos na matéria fresca e seca total, matéria seca da parte aérea e raiz diferiu fortemente com o tipo de inoculo (somente bactérias ou bactéria + fungo) aplicado. Todos os tratamentos contendo isolados bacterianos e consórcio apresentaram valores significativos de massa fresca e seca total, se comparados com os tratamentos controles, tendo incrementos positivos de 148% a 184%, Higuti et al., (2010) relatam que quanto maior for observado os valores de matéria seca das mudas, maior será a quantidade de nitrogênio.

As maiores médias encontradas para essas variáveis foram para os tratamentos 22+T476, 22+T476.A, HRC54,10, 101.A, B2, B2+T476 e B1. Contudo, os tratamentos obtendo o consórcio microbiano tiveram resultados levemente superior a todos os outros.

Para obter alta qualidade de mudas, é relevante que a planta consiga expressar todo o seu potencial vegetativo. Aos 30 dias após o plantio, a máxima área foliar das plantas foi cerca de 55% maior que a área foliar de plantas que não foram inoculadas com os microrganismos utilizados.

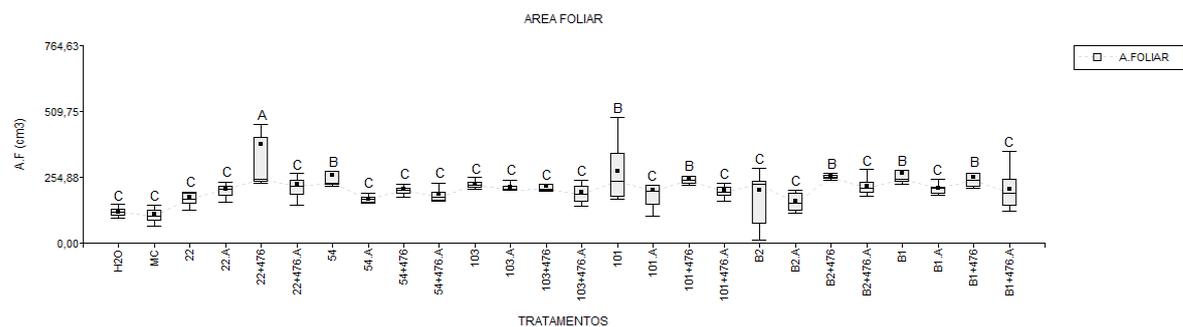


Figura 7. Área foliar de mudas do tomateiro aos 30 dias de plantio cultivadas em ambiente protegido.

O tratamento 22+T476 obteve a maior média entre os tratamentos 382.08 cm², alcançando um incremento 218% em relação aos tratamentos testemunhas (Figura 7), ZECCHIN et al., (2015) verificaram que mudas de tomate inoculadas com a estirpe *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42, promoveram aumento de 47,7% na área da parte aérea de mudas de tomate. Este incremento foi devido a capacidade da estirpe bacteriana sintetizar compostos hormonais como o indol. O aumento da área da parte aérea das mudas de tomate proporciona maior taxa fotossintética, favorecendo produção de compostos químicos que podem ser utilizados pelo próprio vegetal em períodos posteriores, seja de estabelecimento a campo ou ataque de pragas.

Plantas com maiores áreas foliares corresponderam a tomateiros com maior capacidade de prover fotossintatos aos órgãos tidos como drenos, a exemplo de folhas jovens e a manutenção das existentes, mas principalmente para atender a demanda de formação e do desenvolvimento das estruturas reprodutivas (SanMartín-Hernández et al., 2016).

Observa-se na Figura 8 que para a variável altura das mudas, três tratamentos se destacaram, 101, B2 e B2+476, apresentando um percentual de ganho respectivamente de 121, 130 e 131%. Em relação ao controle, Silva (2010) reforça que plantas com crescimento atenuado atingem mais rápido o estágio adulto e permanecem menos tempo no campo, reduzindo a janela de entrada para possíveis perdas com pragas ou doenças, além disso, vale ressaltar que a redução de tempo de plantas no campo está ligada diretamente a redução de custos em geral, incluindo mão de obra, fertilizantes e defensivos agrícolas.

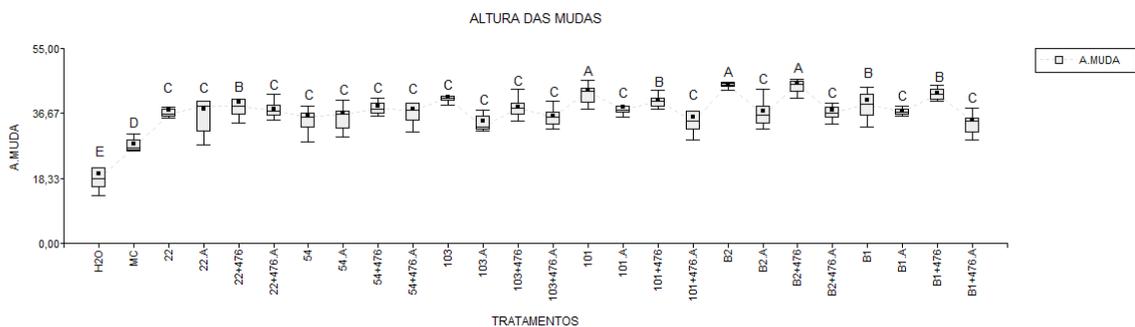


Figura 8 – Altura das mudas de tomateiro aos 30 dias de plantio cultivadas em ambiente protegido.

Esses resultados estão de acordo com Hermosa et al. (2012), que confirmam que algumas linhagens de *Trichoderma* podem interagir diretamente com as raízes, aumentando o crescimento e diâmetro das plantas. Para Harman et al. (2004) o *Trichoderma* otimiza a absorção de nutrientes, melhorando o desenvolvimento vegetativo das plantas. Araújo (2008) concluiu que isolados de *Bacillus subtilis*, juntamente com formulado de farinha de ostras e inoculado nas sementes de milho, apresentaram potencial para incrementar o crescimento e a nutrição das plantas de milho.

Em relação ao volume radicular, todos os tratamentos que receberam a inoculação dos isolados microbianos separados ou em consórcio não diferiram estatisticamente entre si, porém existiu uma diferença significativa quando comparados com os tratamentos controles (H₂O e MC), isso devido a ação em conjunto dos agentes envolvidos, onde os microrganismos utilizados promovem melhora da expansão radicular e, conseqüentemente, a absorção de nutrientes devido a simbiose com as raízes.

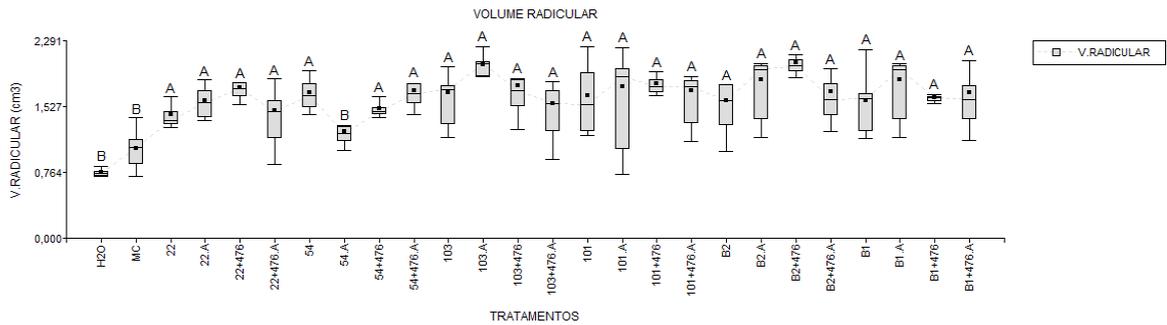


Figura 9 – Volume radicular de mudas tomateiro aos 30 dias de plantio cultivadas em ambiente protegido.

O volume e comprimento total das raízes do tomateiro quando inoculados possuíram um incremento ligeiramente significativo de 22% a 164% em relação as plantas testemunhas (Figura 9), semelhante aos resultados. Saia et al. (2020) encontraram resultados semelhantes em plantas de tomates obtendo um incremento no comprimento total da raiz em 64% e 31% com a inoculação de isolados bacterianos.

Estudos realizados por Oliveira et al. (2016), com sementes de alto vigor associadas com o produto a base de *Bacillus subtilis* apresentaram incremento no comprimento de plântula e comprimento de raiz primária de feijoeiro, beneficiando de forma significativa o desenvolvimento inicial dele. Segundo Bortolin et al., (2019) o sistema radicular das plantas pode ser influenciado pelos tratamentos contendo *Trichoderma sp.* isso porque a presença do fungo permite aumentar a absorção dos nutrientes pelas plantas.

No que se refere a variável diâmetro do caule, apenas os tratamentos HRC54, 101 e B2+T476 obtiveram as melhores medias diferindo-se dos demais tratamentos. A (Figura 10) indica que apenas o tratamento B2.A não diferiu dos tratamentos controles para essa variável. Entre os tratamentos, novamente destacou-se o consórcio microbiano (B2+T476) obtendo um incremento de 81%.

O efeito no diâmetro do colo foi avaliado em outras rizobactérias. Dartora et al., (2013) testaram a combinação das estirpes Ab-V5(*A. brasilense*) e SmR1(*H. seropedicae*) e observaram que na fase vegetativa, o diâmetro basal do colmo em relação à testemunha, teve um incremento de 15% e segundo eles, tal efeito pode ser associado a promoção do crescimento proporcionado pelas bactérias diazotróficas.

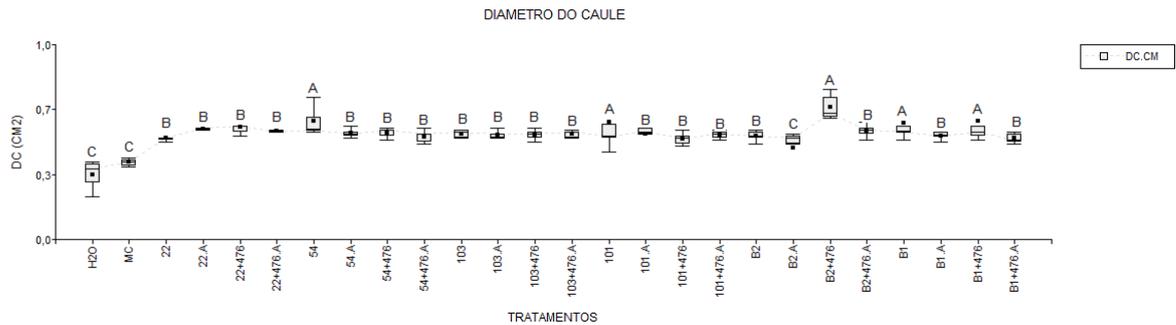


Figura 10 – Diâmetro do colo de mudas tomateiro aos 30 dias de plantio, cultivadas em ambiente protegido.

O diâmetro do colo é uma importante variável para avaliação de mudas, pois o maior DC está associado a um desenvolvimento mais acentuado da parte aérea e, em especial, do sistema radical, favorecendo a sobrevivência e o desenvolvimento da muda após o plantio. Nesse contexto, Souza et al. (2013) destacam que o equilíbrio entre diâmetro do colo e altura das mudas são importantes caracteres morfológicos para se estimar o crescimento das mudas após o plantio definitivo no campo.

Analisando o índice de qualidade de Dickson (IQD), pode-se verificar que, assim como observado para a maioria das variáveis, existiu diferenças significativas entre os tratamentos inoculados de forma única ou consorciada com os tratamentos controles.

Tabela 5: Valores obtidos aos 30 dias de plantio de mudas de “Tomateiro cv Santa Cruz” produzidas em viveiro dos parâmetros: IQD (índice de qualidade de Dickson), RH/DC (relação entre altura e diâmetro do coleto), RHPA/MSR (relação entre a altura da parte aérea e matéria seca das raízes) e RMSPA/, MSR (relação entre a matéria seca da parte aérea e matéria seca da raiz).

TRATAMENTOS	IQD	RH/DC	RHPA/MSPA	RMSPA/MSR
H ₂ O	0,23 B	6,06 A	58,49 A	7,68 A
MC	0,08 C	7,06 A	90,11 B	6,38 A
22GI	0,27 B	6,56 A	63,13 A	8,18 A
22GI.A	0,26 B	6,68 A	51,82 A	8,67 A
22GI+T476	0,34 A	6,98 A	44,92 A	8,70 A
22GI+T476.A	0,28 B	6,84 A	45,50 A	10,22 A
HRC54	0,35 A	5,94 A	41,47 A	8,18 A
HRC54.A	0,26 B	6,74 A	54,69 A	8,16 A
HRC54+T476	0,38 A	7,10 A	49,59 A	8,62 A
HRC54+T476.A	0,29 B	7,20 A	48,88 A	8,31 A
103	0,29 B	7,62 A	52,77 A	7,90 A
103.A	0,29 B	6,40 A	49,55 A	7,32 A
103+T476	0,29 B	7,22 A	51,25 A	7,50 A
103+T476.A	0,24 B	6,70 A	53,46 A	9,67 A
101	0,45 A	7,52 A	55,82 A	7,85 A
101.A	0,37 A	7,10 A	56,67 A	6,09 A
101+T476	0,29 B	7,88 A	54,23 A	7,89 A
101+T476.A	0,24 B	6,62 A	52,70 A	9,60 A
B2	0,28 B	8,46 A	55,38 A	8,94 A

B2. A	0,36 A	8,84 A	55,62 A	7,26 A
B2+T476	0,33 A	6,68 A	48,92 A	7,75 A
B2+T476.A	0,31 B	6,76 A	45,85 A	8,24 A
B1	0,31 B	6,88 A	48,95 A	8,35 A
B1. A	0,29 B	7,00 A	49,22 A	8,09 A
B1+T476	0,29 B	7,22 A	53,50 A	8,37 A
B1+T476.A	0,21 B	6,72 A	60,62 A	9,02 A
CV	27,74	16,63	19,22	26,76

Os maiores índices ocorreram nos tratamentos 22GI+T476, HRC54, HRC54+T476, 101, 101.A, B2.A e B2+T476, com valor máximo de 0,45, para o tratamento 101 (Tabela 5). Na literatura, são escassos relatos sobre o efeito de soluções nutritivas sobre o IQD em mudas de hortaliças.

O índice de qualidade de Dickson é um bom indicador da qualidade das mudas, pois apresenta robustez e o equilíbrio da distribuição da biomassa na muda, ponderando os resultados de vários parâmetros importantes empregados para avaliação da qualidade (Fonseca et al., 2002). Segundo Hunt (1990), para as mudas exibirem padrão aceitável de qualidade devem apresentar IQD superior a 0,20, valores alcançados nesse trabalho.

Quanto maior for o valor deste índice, melhor será a qualidade da muda produzida (Gomes, 2001). O IQD é um indicador da qualidade de mudas, pois em seu cálculo são considerados a robustez e o equilíbrio da distribuição da biomassa da muda (Fonseca et al., 2002).

Para a relação altura/ diâmetro do caule (RH/DC) não houve diferença significativa entre os tratamentos analisados, porém foram observados valores nas faixas de 8,84 a 5,94 menor valor encontrado no tratamento HRC54. Segundo Carneiro (1995), a RH/DC exprime o equilíbrio de desenvolvimento das mudas, pois conjuga duas importantes características em apenas um só índice, e quanto menor for o seu valor, melhor a qualidade da muda e, conseqüentemente, maior a capacidade de sobrevivência e estabelecimento no local de plantio definitivo.

Os melhores índices foram encontrados para mudas produzidas em ambiente protegido/ casa de vegetação aos 30 dias de plantio, indicando que existiu um equilíbrio entre as médias de altura e diâmetro do coleto de todos os tratamentos (Tabela 5). Resultados semelhantes foram encontrados por Dos Santos et al. (2016) que para Tomate Cereja Pendente Yubi, Santa Amélia e Santa Adélia encontraram valores máximos de 5,56; 4,37 e 4,48 respectivamente.

A relação RHPA/MSPA, segundo Gomes e Paiva (2004), demonstra que, quanto menor o valor do índice, maior é chance de sobrevivência da muda no

campo, sendo um indicativo do quanto estão lignificadas às plantas. Não existiu diferenças estatísticas entre os tratamentos, somente o tratamento MC apresentou maior média e diferiu dos demais. Os outros tratamentos se igualaram estatisticamente e evidenciam a qualidade das mudas produzidas, tendo como os menores valores 41,47, 44,92 e 45,50, assim não existindo diferença de condução no ensaio, indicando mudas de qualidade.

A relação peso de matéria seca da parte aérea/peso de matéria seca de raízes (RMSPA/MSR) não se observou diferença significativa entre os tratamentos obtendo médias menores 6,09 e maiores de 10,22. De acordo com Gomes (2001), normalmente essa relação não é utilizada como um índice para avaliar o padrão de qualidade das mudas, mas pode ser de grande interesse para prever o potencial de sobrevivência das mudas no campo, sendo que, quanto menores forem os quocientes obtidos, maior sua capacidade de sobrevivência.

Porém, Brissete (1984), citado por Gomes (2001), relata, após um consenso de pesquisadores, que o índice “2,0” expressa a melhor relação entre o peso de matéria seca da parte aérea e o peso de matéria seca do sistema radicular para plantas arbóreas. Por outro lado, o aumento desta relação indica, geralmente, que as condições de crescimento são mais favoráveis.

Diante dos resultados obtidos no ensaio I, de promoção de crescimento, foi possível observar que de todos os tratamentos, dois se destacaram apresentando as melhores médias para os parâmetros de crescimento analisados (B2+T476; 22GI+T476) que revezaram entre as melhores médias nos resultados observados. Diante disso, sugeriu-se a criação de novos consórcios microbianos, tendo esses dois isolados bacterianos e um fúngico como base para o ensaio subsequente (ensaio II).



Figura 11. Imagem ilustrativa das mudas de tomate cv Santa Cruz, microbiolizadas com diferentes fontes de inoculos microbianos, em consórcio ou solteiros. D= H₂O (não inoculado), C= Meio de cultivo MC; B= B2 e A= B2+T476.

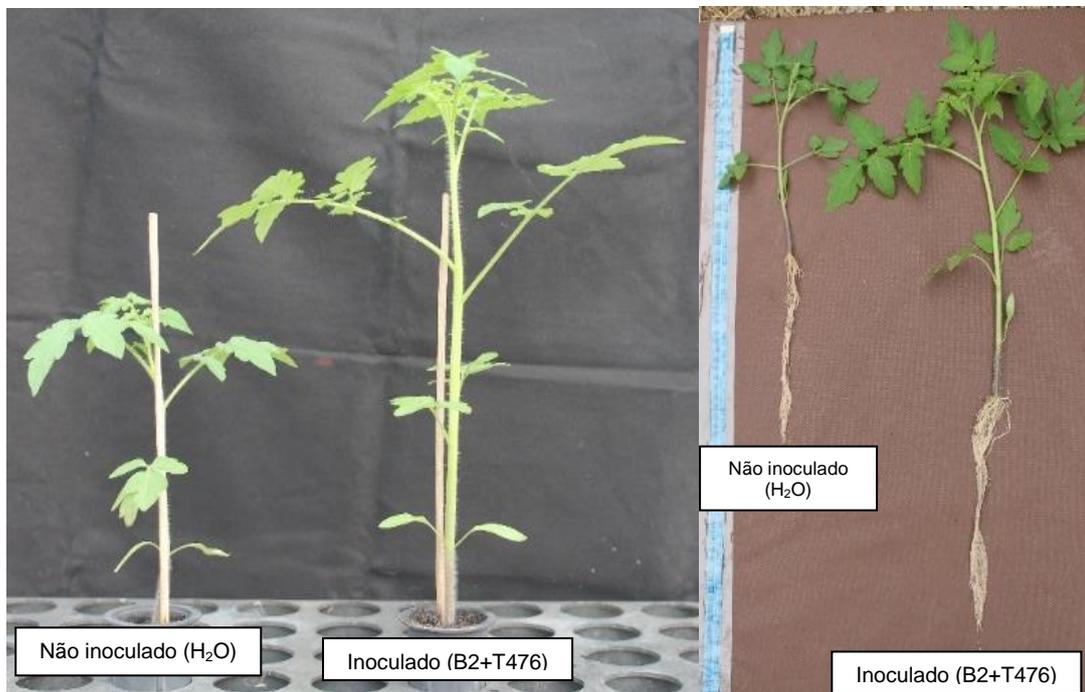


Figura 12. Imagem ilustrativa do contraste entre os tratamentos H₂O (não inoculado) e B2+T476 (*Bacillus safensis* J1.1 + *Trichoderma longibrachiatum* cepa T476) em mudas de tomate.

4.3 Resposta de crescimento de plantas de tomateiro inoculadas com diferentes combinações de isolados microbianos em casa de vegetação (ensaio II)

A inoculação combinada (B2+22GI+S7 e B2+22GI+A7) em plantas de tomate em condições de casa de vegetação promoveram aumentos significativos nas variáveis analisadas. Estes efeitos tornam-se mais evidentes, pois os tratamentos inoculados com o consórcio microbiano tiveram um desenvolvimento superior aos tratamentos controles.

Na (Tabela 6) são apresentados os quadrados médios dos contrastes ortogonais para as variáveis altura da muda total (AMT), matéria seca total (MST), área foliar (A.F) e volume radicular (V. R). Analisando o contraste (H₂O) vs (TRAT), observou-se diferenças significativas para todas as variáveis apresentadas AMT, MST, A.F e V. R (Tabela X), realçando a diferença estatística entre os tratamentos que obtiveram inoculação para a testemunha absoluta (H₂O). Todos as combinações promoveram incrementos significativos quando comparados ao tratamento controle.

Entretanto, comparado o efeito da aplicação do T476 no dia da inoculação ou sete dias antes, foi possível observar que o isolado T476 aplicado sete dias antes (B2+22+TS7 e B2+22+TA7) apresentaram melhores quadrados medidos diferindo estatisticamente para todas as variáveis dos demais tratamentos (Tabelas 6). Com relação à área foliar, os tratamentos (B2+22+TS7 e B2+22+TA7) se destacaram, obtendo diferenças estatísticas entre os demais tratamentos. De acordo com Marengo e Lopes (2005), o maior desenvolvimento foliar em mudas é desejável, pois as folhas são os órgãos da planta responsáveis pelos processos de conversão de energia luminosa em energia química (fotossíntese). Para a variável altura das mudas, as combinações (B2+22+TS7, B2+22+TA7 e B2+22GI) apresentam os melhores quadrados médios aos seus contrastes, diferindo estatisticamente dos outros tratamentos. Silva et al. (2008), aplicando *B. pumilus*, observaram incrementos na altura das plantas de tomateiro nos estágios iniciais do desenvolvimento.

Tabela 6: Valores de quadrado médio para análise de contrastes ortogonais para avaliação de parâmetros biométricos: Altura da muda total – AMT, Matéria Seca Total – MST, Area Foliar – AF e Volume Radicular – V. R, em mudas de tomate aos 30 dias de cultivo.

Contrastes	Fontes de Variação			
	AMT	MST	A. FOLIAR	V.R
(H2O) vs (TRAT)	1,79*	4,44 *	6,04 *	2,78 *
(H2O) vs (B2+22GI)	1,42*	3,18 *	2,61 *	1,16
(H2O) vs (B2+22+T476)	3,09	1,09	2,10	1,51
H2O) vs (B2+22+TA7)	1,79*	3,80	6,53 *	3,16 *
(H2O) vs (B2+22+TS7)	1,79*	4,45	9,70 *	2,82 *
(H2O) vs (B2+22+TAD)	5,66	1,60	6,16	4,80
(MC) vs (TRAT)	1,89*	1,07	1,89	1,19
(MC) vs (B2+22GI)	1,49*	0,91	6,06	3,98
(MC) vs (B2+22+T476)	3,44	0,04	3,73	6,19
(MC) vs (B2+22+TA7)	1,87*	1,25	2,94 *	1,77 *
(MC) vs (B2+22+TS7)	1,88*	1,66	5,17 *	1,52 *
(MC) vs (B2+22+TAD)	6,13	0,19	2,94	6,11
(T476) vs (TRAT)	6,35	0,01	4,56	6,00
(T476) vs (B2+22GI)	6,98	0,06	5,60	7,58
(T476) vs (B2+22+T476)	1,90	0,23	4,70	1,44
(T476) vs (B2+22+TA7)	8,46*	0,17	1,37	1,82
(T476) vs (B2+22+TS7)	8,50*	0,34	3,00 *	1,07
(T476) vs (B2+22+TAD)	1,11	0,06	3,55	4,32

Para o volume do sistema radicular (Tabela 6), as combinações (B2+22+TS7 e B2+22+TA7) responderam positivamente e foram superiores à testemunha em condição de casa de vegetação, Jindapunnapat e colaboradores (2013) investigaram os efeitos de uma formulação comercial à base de *T. harzianum* sobre *M. enterolobii* e concluíram que 30 dias após a inoculação de nematoides o fungo estimulou o crescimento radicular das plantas.

Para o ensaio II, os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram submetidas ao teste de Tukey a 1% de significância.

Os tratamentos com o consórcio microbiano e a aplicação do isolado T476 sete dias antes do plantio diretamente no substrato (B2+22+TS7 e B2+22+TA7) apresentaram maior massa seca total (MST) das mudas de tomate, diferenciando-se significativamente do controle (Figura 13). Os tratamentos T476, B2+22 e B2+22+TAD foram superiores ao tratamento controle (H₂O) diferenciando todos os tratamentos que receberam inoculação da testemunha. (Figura 13).

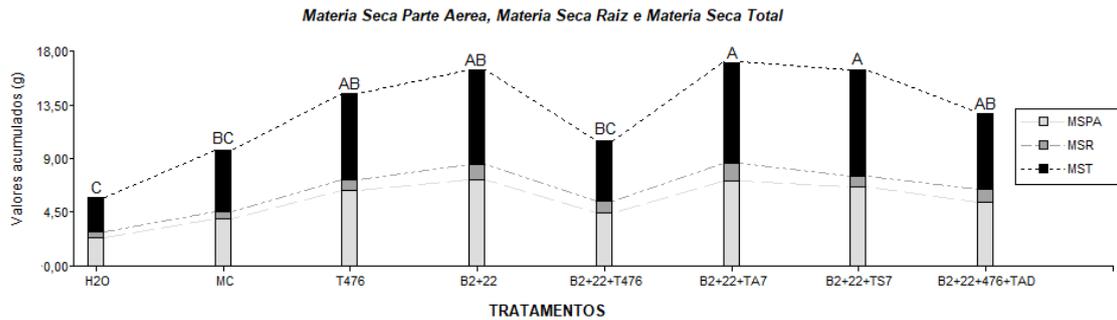


Figura 13. Produção de matéria seca da parte aérea MSPA, matéria seca da raiz MSR e matéria seca total MST de mudas de tomate aos 30 dias de cultivo em ambiente protegido com diferentes consórcios microbianos.

Os valores analisados de matéria seca total corroboram com as de promoção de crescimento (ensaio I) apresentados anteriormente (Figura 13). Todos os tratamentos contendo os isolados utilizados (B2, 22GI e T476) apresentaram valores significativos de matéria seca total, se comparados com os tratamentos controles, Araújo e Carvalho (2009) observaram em ensaio conduzido com tomate cultivar Santa Clara, que o tratamento com *Bacillus subtilis* influenciou o crescimento das plantas em variáveis como produção de biomassa da parte aérea, quando comparado à testemunha.

Verificou-se ainda que os tratamentos (B2+22+TS7 e B2+22+TA7) tiveram um incremento de 100% em relação ao tratamento controle. Segundo Saharan e Nehra (2011), a inoculação com bactérias promotoras de crescimento pode beneficiar as plantas no estágio vegetativo potencializando a emergência, vigor, altura, peso da planta, disponibilização de nutrientes e aumento na clorofila. Por outro lado, cada cultura, dependendo das necessidades, seleciona os microrganismos através da raiz (exsudatos) e, posteriormente, esses microrganismos colonizam o solo e tecidos internos da planta (Hallmann et al., 1997; Hardoim; Van Overbeek; Elsas, 2008).

Na produção de mudas houve incrementos na área foliar principalmente no tratamento (B2+22+TS7) com um incremento de 76% em relação ao tratamento controle (Figura 14). Uma área foliar maior permite melhor taxa fotossintética, que implica em mais fotoassimilados translocados para os órgãos em crescimento ou de reserva nos estádios seguintes (Taiz e Zeiger, 2004).

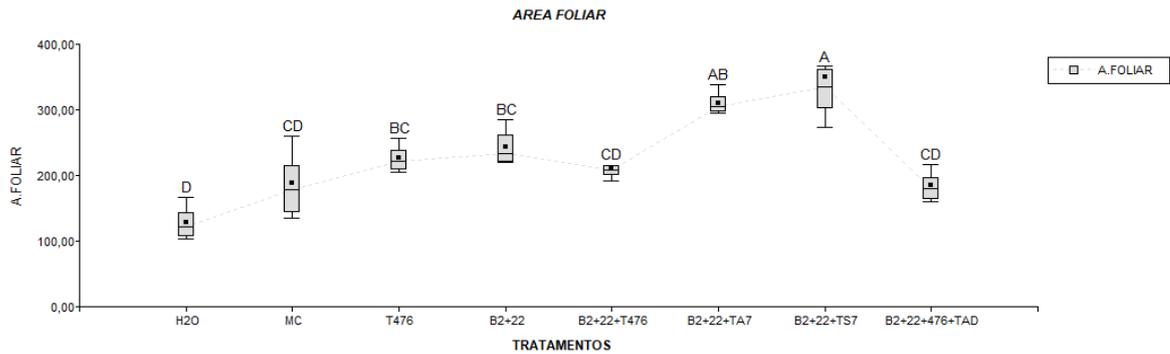


Figura 14 – Área foliar de mudas do tomateiro aos 30 dias de plantio cultivadas em ambiente protegido com diferentes consórcios microbianos.

Este aumento da parte aérea pode estar relacionado com a habilidade da bactéria estudada em produzir compostos indólicos. Alguns estudos demonstraram que *Bacillus* produtores de auxina trazem benefícios para a parte aérea do tomateiro, aumentando a altura, calibre e peso fresco de parte aérea de mudas (Domenech et al., 2006). Barreti, Souza e Pozza (2008), relataram aumento da altura, área foliar, número de folhas e peso da matéria fresca e seca, tanto da parte aérea quanto da raiz de plantas inoculadas com *Bacillus cereus*.

Para os tratamentos inoculados, o aumento no crescimento da altura das mudas foi estatisticamente significativo quando comparados ao tratamento controle, tendo um incremento de 25%. Esses resultados indicam o efeito benéfico no crescimento das mudas de tomate (Figura 15). Isolados de *Bacillus subtilis* também apresentaram respostas positivas para o crescimento das plantas de milho, bem como para o acúmulo de nitrogênio (Aquino et al., 2019).

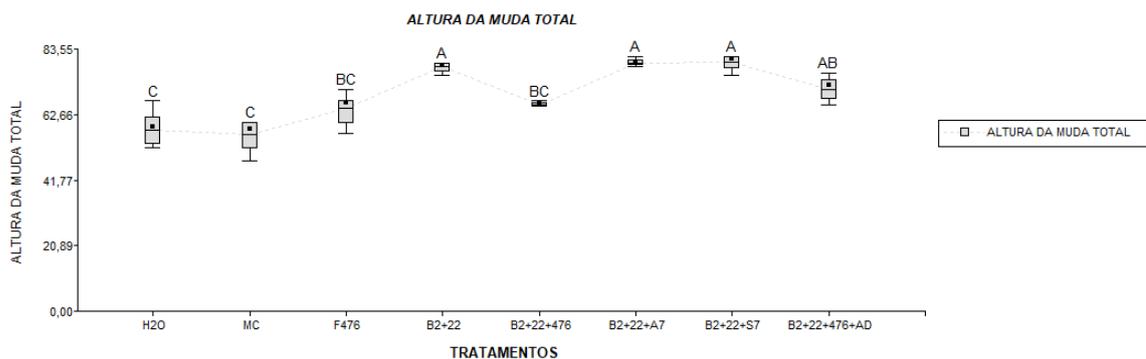


Figura 15 – Altura das mudas de tomateiro aos 30 dias de plantio cultivadas em ambiente protegido com diferentes consórcios microbianos.

Assim como no presente trabalho, os autores Esquivel-Cote et al. (2017), ao realizar experimento com o tomate da variedade Juanita, avaliando o crescimento aos 71 DDS (Dias depois da sementeira), constataram que as estipes de *Azospirillum sp.*, *Azospirillum lipoferum* e *Azospirillum brasilense* apresentaram crescimento superior em relação ao tratamento não inoculado.

Quanto ao volume radicular, os maiores valores (Figura 16) encontrados foram para os tratamentos (B2+22+TS7, B2+22+TA7 e T476) diferenciando do tratamento controle, com um incremento de até 63%. De acordo com Kilian et al. (2000) a bactéria do gênero bacillus são capazes de colonizar as raízes das plantas, formando um biofilme ao redor da raiz, podendo produzir metabólitos que estimulam os fitormônios vegetais e a solubilização e mobilização de nutrientes no solo, induzindo o crescimento das raízes e promovendo o melhor desenvolvimento de plantas.

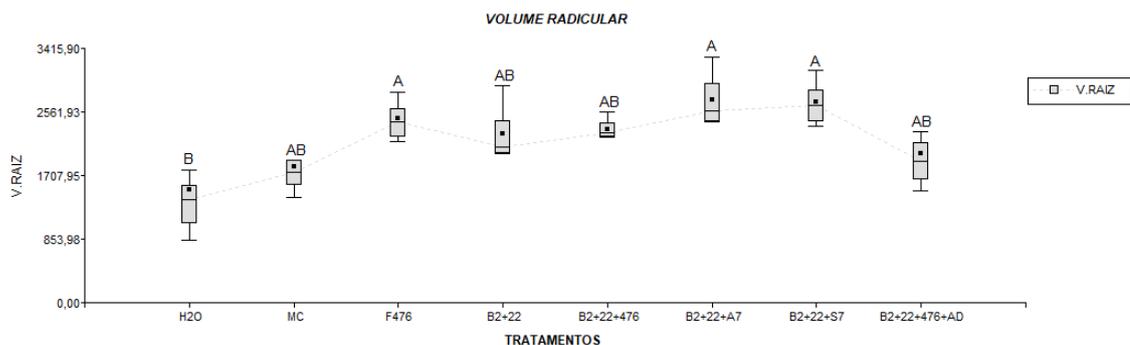


Figura 16. Volume radicular de mudas de tomateiro aos 30 dias de plantio cultivadas em ambiente protegido com diferentes consórcios microbianos.

Com o estímulo ao crescimento radicular, a planta consegue aumentar sua capacidade de absorção, melhorando o aproveitamento dos nutrientes do solo, sua nutrição e diminuindo as perdas de nutrientes por lixiviação, como, por exemplo, no caso do nitrogênio, ou por adsorção, como no caso do fósforo. Violante e Portugal (2007) obtiveram uma melhora do sistema radicular de plantas de tomate com a inoculação de *B. subtilis*, sendo que o comprimento da raiz chegou a um aumento de 15% e a massa das raízes aumentaram até 26%.

Segundo Contreras-Cornejo et al. (2009), a aplicação de *Trichoderma* tem proporcionado além de aumentos na porcentagem e precocidade de germinação, assim como no peso de matéria seca, na altura das plântulas e no desenvolvimento das raízes laterais.

Com relação ao diâmetro do caule das mudas, foi observado diferença estatística entre os tratamentos, tendo a melhor média para a combinação (B2+22+TS7) com incremento de 20% em relação a testemunha, seguido de (T476, B2+22+TA7 e B2+22+TAD). Somente o tratamento (B2+22) se igualou a testemunha absoluta (H2O) e meio de cultivo (MC), assim diferenciando dos demais tratamentos (Figura 17).

O diâmetro de colo reflete em parte o estágio de vigorosidade e tem relação bem mais específica do que a sustentação vegetal, sobretudo a eficiência na translocação de foto assimilados raiz-parte aérea.

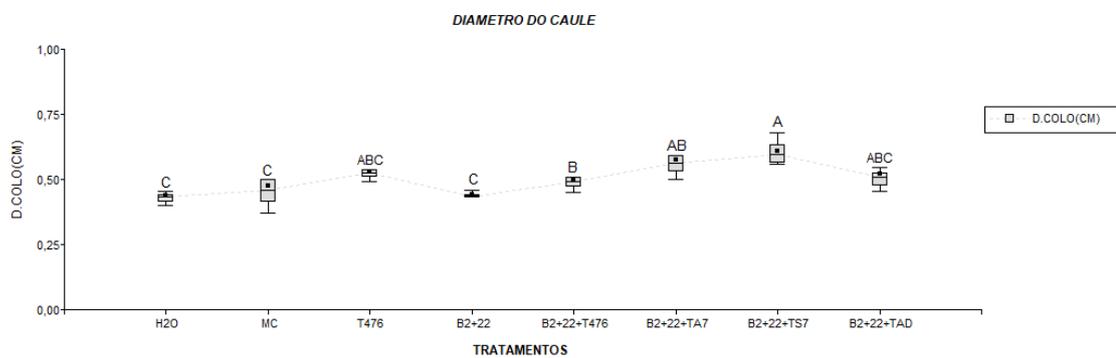


Figura 17. Diâmetro do caule de mudas de tomateiro aos 30 dias de plantiocultivadas em ambiente protegido com diferentes consórcios microbianos.

Todavia, é importante admitir a escolha de cultivares, tipos de tratamentos e utilização de microrganismos que influenciem no diâmetro do colo mais espesso, o que poderá implicar no vigor geral da planta e sua capacidade produtiva (Costa et al., 2013).

Para o índice SPAD aos 30 dias, observa-se que os maiores valores obtidos foram com os tratamentos (T476, B2+22+TA7 e B2+22+TS7), com os respectivos valores 23,78, 22,90 e 23,84 SPAD, superando significativamente os demais tratamentos avaliados. Para Roesch et al. (2006), as BPCV se tornam ineficientes quando submetidas a altas doses de N durante os primeiros estágios de crescimento. No entanto, na ausência total de adubação nitrogenada, como é o caso do presente estudo, pode ter estimulado a FBN da atmosfera.

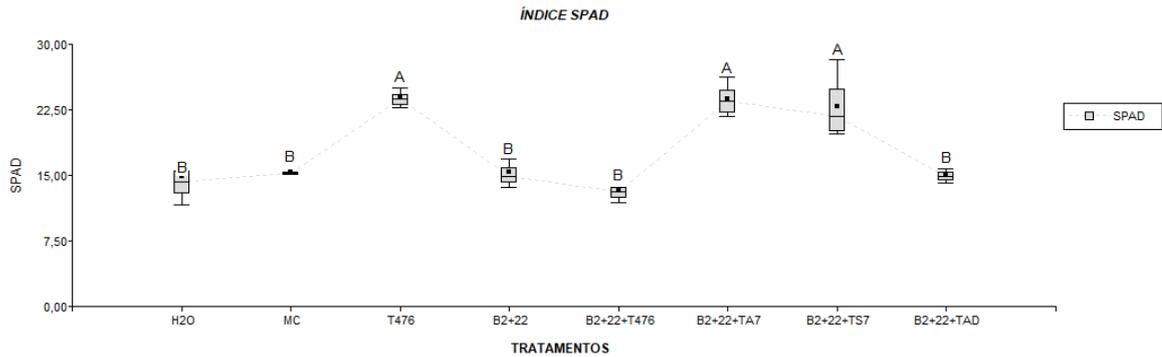


Figura 18 – Índice SPAD de mudas de tomateiro aos 30 dias de plantio cultivadas em ambiente protegido com diferentes consórcios microbianos.

No entanto, o tratamento B2+22+TS7 apresentou um aumento em relação aos demais tratamentos, sendo de 61%, seguido. Quadros (2009) observou em estudo realizado durante o estágio vegetativo do milho inoculado com *A. brasilense*, aumento de 7% no índice SPAD quando comparado ao tratamento sem inoculação.

Os índices de qualidade das mudas variaram de 0,04 (H₂O) a 0,10 (B2+22, B2+22+TA7 e B2+22+TS7) (Tabela 7) e apresentaram respostas distintas entre si, sendo que os tratamentos que tiveram a inoculação do isolado T476 diretamente no substrato sete dias antes (B2+22+TA7 e B2+22+TS7) apresentaram as melhores médias, junto com B2+22 inoculado diretamente na semente, obtendo os maiores valores de IQD. Por outro lado, o a testemunha absoluta (H₂O) proporcionou o menor desempenho das mudas, diferindo aos demais tratamentos (Tabela 7). Gomes e Paiva (2004) relatam que, quanto maior o valor do IQD, melhor será o padrão de qualidade das mudas.

O índice de qualidade de Dickson é um bom indicador da qualidade das mudas pois é considerado o vigor e o equilíbrio da distribuição da biomassa na muda (Azevedo et al., 2010).

Da silva et al. (2012), trabalhando com a Influência de casca de arroz carbonizada em diferentes substratos na qualidade de mudas de tomateiro, apresentaram valores inferiores aos encontrados nesse estudo.

Tabela 7:- Valores obtidos aos 30 dias de plantio de mudas de “Tomateiro cv Santa Cruz” produzidas em viveiro com diferentes consórcios microbianos: IQD (índice de qualidade de Dickson), RH/DC (relação entre altura e diâmetro do coleto), RHPA/MSR (relação entre a altura da parte aérea e matéria seca das raízes) e RMSPA/MSR (relação entre a matéria seca da parte aérea e matéria seca da raiz).

TRATAMENTOS	IQD	RH/DC	RHPA/MSPA	RMSPA/MSR
H ₂ O	0,04 B	10,68 A	102,40 A	4,68 A
MC	0,07 AB	11,68 A	63,40 A	6,78 A
T476	0,08 AB	12,60 A	44,35 A	7,48 A
B2+22	0,10 A	13,95 A	43,68 A	6,15 A
B2+22+T476	0,07 AB	12,90 A	47,20 A	3,40 A
B2+22+TA7	0,10 A	15,40 A	42,20 A	4,00 A
B2+22+TS7	0,10 A	13,93 A	44,30 A	6,70 A
B2+22+TAD	0,08 AB	12,70 A	41,90 A	3,80 A
CV	1,81	9,75	25,55	28,36

A relação altura/diâmetro do colo aos 30 dias, quando as mudas possuem idade para serem transplantadas, não apresentou diferenças estatísticas significativas. Esta relação determina o crescimento adequado das mudas, com aumento proporcional entre altura e colo, ou seja, o aumento da altura da plântula foi acompanhado do aumento da espessura do colo, não caracterizando estiolamento delas, nos recipientes e ou substratos. Todas as mudas apresentaram capacidade de sobrevivência quando transplantadas definitivamente no campo.

A relação entre altura da parte aérea e matéria seca da parte aérea, assim como a relação entre a matéria seca da parte aérea e radicular, não apresentaram diferenças significativas para os distintos tratamentos. Porém, quanto menores são os valores dessas relações, melhor é.

Os tratamentos B2+22GI+S7 e B2+22GI+A7 com a inoculação sete dias antes do isolado fúngico T476 dos isolados B2+22GI+S7 e B2+22GI+A7 foram os que apresentaram resultados mais promissores na promoção de crescimento de plantas de tomate, aumentando e acelerando a germinação (dados não apresentados), obtendo um acúmulo total de biomassa expressivo dessas plantas em casa de vegetação. Isso significa um avanço na busca de tecnologias para inoculação combinada de bactérias+ fungo.

Esses resultados obtidos indicam que os tratamentos à base de uma inoculação combinada, com a inoculação do isolado fúngico T476 antes de sete dias do plantio diretamente no substrato é capaz de colonizar e influenciar nos estágios iniciais das plantas de tomateiro.



Figura 19. Imagem ilustrativa da diferença do comprimento e volume radicular de plantas inoculadas e não inoculadas com o consórcio microbiano. H₂O = A; B2+22= B; B2+22+T476=C; B2+22+TS7=D.



Figura 20, Imagem ilustrativa da diferença do comprimento da parte aérea de plantas inoculadas e não inoculadas com consórcio microbiano. H₂O= D; B2+22= C; B2+22+T476=B; B2+22+TS7=A.

4.4 Contagem do número de células das estirpes inoculadas pela técnica do Número Mais Provável (NMP) e Unidade Formadora de Colônias (UFC)

A técnica do NMP foi usada para a identificação da ocorrência de bactérias diazotróficas dentro dos tecidos das mudas de tomateiro cultivar Santa Cruz e confirmar a possível presença dos isolados inoculados nas mudas em meio JNFb. Para isso, foi comparado o valor do NMP encontrado no tecido das mudas inoculadas com o consórcio microbiano e o NMP encontrado no controle (Figura X).

O valor encontrado do NMP de cada um dos isolados foi em uma diluição maior que aquele obtido para o controle. Exceto para as mudas dos tratamentos T476 e B2+22+TAD que apresentaram valor igual de diluição comparada ao controle.

Análise de dados pelo NMP mostram que houve diferença significativa na contagem da população de bactérias diazotróficas endofíticas nos diferentes tratamentos após 30 dias de inoculação (Figura 21). A concentração de células de bactérias diazotróficas variou entre 10^8 até 10^{10} . Os tratamentos com valores dentro da diluição 10^{-10} foram: B2+22+T476, B2+22+TA7 e B2+22+TS7.

Estudos realizados por Perin (2003) sobre a colonização de *G. diazotrophicus* em variedades de cana-de-açúcar encontraram uma população da referida bactéria em torno de 10^5 e 10^6 células g^{-1} de plântulas de 30 a 88 dias após o plantio.

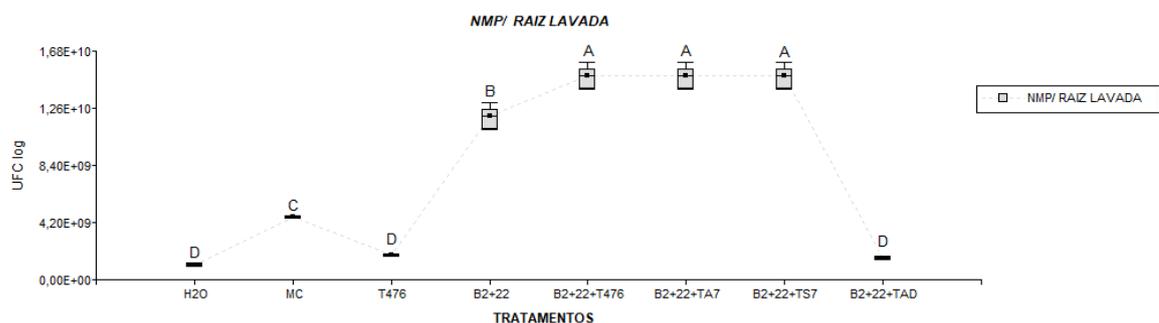


Figura 21. Número mais provável NMP de células bacterianas utilizando meio JNFb em raiz lavada de mudas tomate, para quantificação dos isolados bacterianos.

Na (Figura 21) pode-se observar que o número de bactérias nos tratamentos inoculado somente com os isolados bactérias e com o consórcio (bactéria- fungo) foram maiores que o tratamento não inoculado, resultados esses que corroboram

com os encontrados por Silva (2009). A autora mostrou que a mistura das estirpes proporcionou uma colonização ao redor de $3 \times 10^5 \text{ g}^{-1}$ de massa fresca para a estirpe no momento da inoculação com ligeiro crescimento atingindo um valor populacional ao redor de 10^6 g^{-1} massa fresca aos 30 dias.

Nos tratamentos onde não houve inoculação de bactérias, controle (H_2O) e meio de cultivo (MC), houve a presença de bactérias diazotróficas, provavelmente, devido à contaminação natural dos tecidos por outros microrganismos diazotróficos capazes de sobreviver em outros ambientes que não endofíticos, como no solo, os quais pode-se chamar de microbiota nativa. A presença de microrganismos em tecidos de plantas não inoculadas é comum, já que os meios utilizados na técnica do NMP não são seletivos para os isolados utilizados, mas semisseletivos, podendo detectar a presença de outros microrganismos diazotróficos Canuto (2003).

No entanto, nas condições avaliadas, a aplicação conjunta de bactérias + fungo estimulou o crescimento da população de bactérias inoculadas nas plântulas de tomate, obtendo resultados superiores em relação as demais tratamentos (Figura 22).

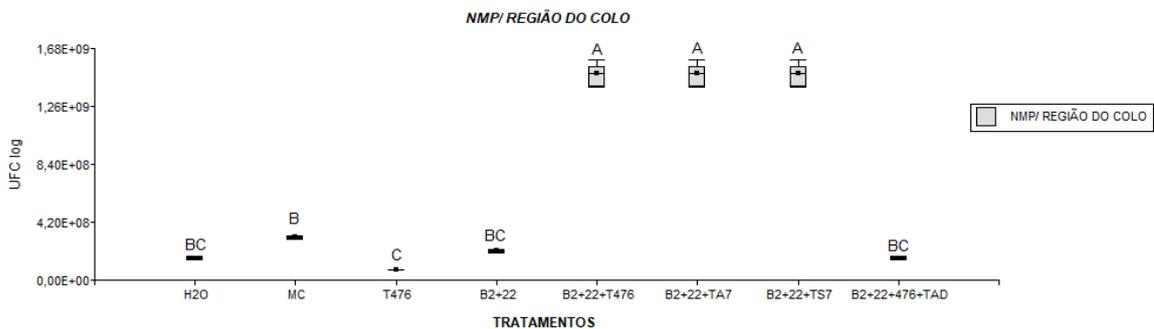


Figura 22. Número mais provável NMP de células bacterianas utilizando meio JNFb na região do colo de mudas de tomate, para quantificação dos isolados bacterianos.

O valor encontrado do NMP para região do colo acompanhou os resultados obtidos no NMP para região da raiz, tendo as melhores médias nos tratamentos (B2+22+T476, B2+22+TA7 e B2+22+TS7), chegando na casa logarítmica de 10^9 .

A inoculação com (B2+22+T476, B2+22GI+TA7 e B2+22GI+TS7), nos tratamentos promoveu incremento de duas unidades logarítmicas em relação às mudas controle. Assim, a inoculação mostra-se viável para bactérias diazotróficas nas plantas de tomate, o que garante a sobrevivência dessas bactérias, no recobrimento, até a emissão das raízes pelas plantas, como observado por Conceição et al., (2008).

A estimativa da densidade populacional de microrganismos foi determinada utilizando o método de contagem por unidades formadoras de colônias, e os valores expressos em $\log_{10} \cdot g^{-1}$ de raiz fresca. Para a contagem de bactérias foi utilizado o meio NB (Nutrient Broth) sólido.

Após a contagem das bactérias no meio NB sólido, foi observado maior número de células bacterianas nos tratamentos no qual houve uma inoculação conjunta de bactéria + fungo, corroborando com os resultados anteriores do NMP.

Os resultados obtidos indicam a influência do consórcio microbiano na manutenção e aumento das células bactérias inoculadas nas sementes e substrato das mudas de tomate. O isolado T476 influenciou positivamente na sobrevivência das bactérias no sistema solo-planta-raiz. As análises revelaram diferença significativa na sobrevivência das bactérias quando co-inoculadas com o isolado T476. Além disso, em todos os meios de cultivos utilizados para isolamento e contagem das bactérias, houve o crescimento do T476 quando co-inoculado com bactérias, demonstrando persistência de associação fungo-bactéria.

Tabela 8: Estimativa da comunidade bacteriana associada à raízes de mudas de tomates inoculadas e não inoculadas, e expressa por unidades formadoras de colônias UFC.

Tratamentos-Raiz Lavada RL	Unidade Formadoras de Colônias - UFC	Diversidade
T1	$4,4 \times 10^7$	4
T2	$2,3 \times 10^8$	3
T3	$2,6 \times 10^7$	2
T4	$3,7 \times 10^8$	2
T5	$5,0 \times 10^8$	2
T6	$3,2 \times 10^8$	2
T7	$2,5 \times 10^7$	3
T8	$2,6 \times 10^7$	3

Seneviratne e Jayasinghearachchi (2003) observaram que tratamentos com exsudados de fungos do solo aumentou significativamente a UFC de *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 5019. Utilizando dois fungos saprófitos, sendo um desses pertencentes ao gênero *Trichoderma* como em nosso estudo, Rudnick et al., (2015) relataram que parte das bactérias do solo foram capazes de colonizar as hifas dos fungos e obterem alimentos através dessas, convertendo em biomassa bacteriana.

A presença de *T. longibrachiatum* aumentou significativamente a sobrevivência das bactérias até os 30 dias de cultivo (Figura 21 e 21 e Tabela 8).

Quando co-inoculadas com o fungo, foi possível a detecção bacteriana na casa logarítmica acima de 10^5 , tanto para UFC quanto para NMP. A sobrevivência de bactérias no curso do tempo é fundamental para o sucesso dos inoculantes. Acea et al., (1988) reportaram o declínio das populações bacterianas de gêneros distintos com o tempo em solo natural e esterilizado. A baixa sobrevivência das células bacterianas não foi associada a presença de toxinas ou a escassez de alimentos no solo, e sim pela competitividade da comunidade microbiana nativa.

As interações mutualísticas em formas de biofilmes estruturados entre bactérias e fungos pode ser uma estratégia plausível para o desenvolvimento e uso de inoculantes mistos.

Nos tratamentos que tiveram a presença dos isolados utilizados no ensaio foi possível observar menor diversidade em relação ao tratamento controle (H_2O), porém ao final da avaliação das unidades formadoras de colônias UFC foi observada a presença dos isolados inoculados no início do ensaio.

4.5 Atividade microbiana no solo – FDA

A atividade microbiana total (concentração de fluoresceína) foi analisada em 9 substrato oriundos dos tratamentos utilizados no ensaio II de promoção de crescimento e um como controle absoluto (substrato autoclavado). A atividade de hidrólise variou amplamente nesses solos. Nos solos inoculados com o consórcio microbiano (Bactéria + Fungo) foram os tratamentos que apresentaram maior atividade microbiológica. Esses tratamentos apresentaram 4.405 e 4.556mg FDA hidrolisada / 60min $1g^{-1}$ de solo, respectivamente (Figura 23).

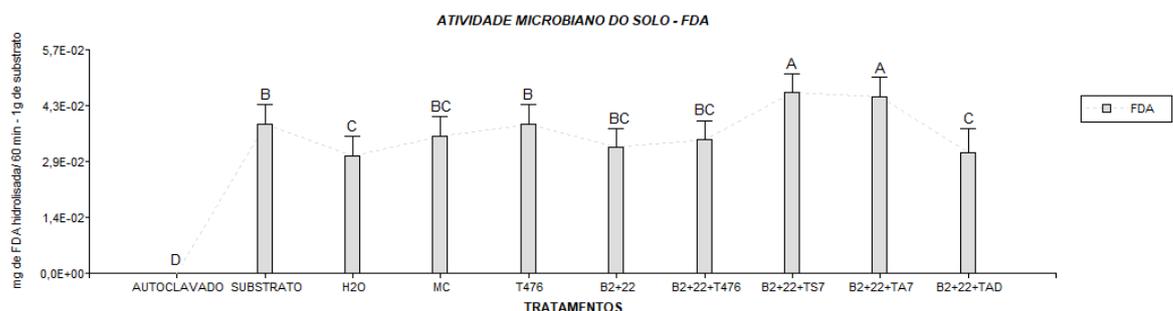


Figura 23. Atividade microbiana do solo – FDA, através da degradação da Fluoresceína/g em substrato de mudas de tomate aos 30 dias de cultivo.

Dentre os tratamentos analisados houve diferença estatística, tendo as maiores atividades os tratamentos (B+22+TA7 e B2+22+TS7). A atividade microbiológica foi maior no tratamento com a inoculação combinada, provavelmente por este apresentar maior sobrevivência dos isolados durante os 30 dias de cultivo. Ressalta-se que o tratamento com espécies nativas (solo não autoclavado) apresentou uma atividade microbiana superior ao tratamento (B2+22+TAD), e isso se deve à biodiversidade maior presente nesse tratamento.

A hidrólise do FDA aumentou com a adição do fungo no substrato. Estudos anteriores mostraram que todos os fungos investigados Medzon e Brady (1977) e Soderström (1969), a maioria das bactérias Lundgren (1981) e alguns protozoários e algas exibem atividade hidrolítica FDA. A capacidade de hidrolisar FDA, portanto parece generalizado, especialmente entre os principais decompositores-bactérias e fungos.

4.6 Estimativa do conteúdo de proteínas solúveis, lipídios e carboidrato total em plantas de tomate aos 30 dias de cultivo em ambiente protegido

O conteúdo de proteínas solúveis em folhas de tomate não obteve diferença significativa entre os tratamentos. O maior teor encontrado foi para o tratamento B2+22 de 1,001 de proteína/g MS em tampão Tris-HCl. As proteínas são encontradas em todas as partes da célula vegetal e são fundamentais sob todos os aspectos estruturais e funcionais da célula (BRAY, 2000).

Os valores do teor de lipídios totais dos tratamentos B22+22, B2+22+T476 e B2+22+TS7 foram superiores aos demais tratamentos evidenciando um incremento de 103% em relação a testemunha, mostrando-se ligeiramente superior aos mesmos. Resultados encontrados nesse trabalho vão de acordo com os de Gondim et al. (2005) e Souza et al. (2007) que também encontraram valores inferiores a 1% de lipídios em talos e cascas de vegetais analisados.

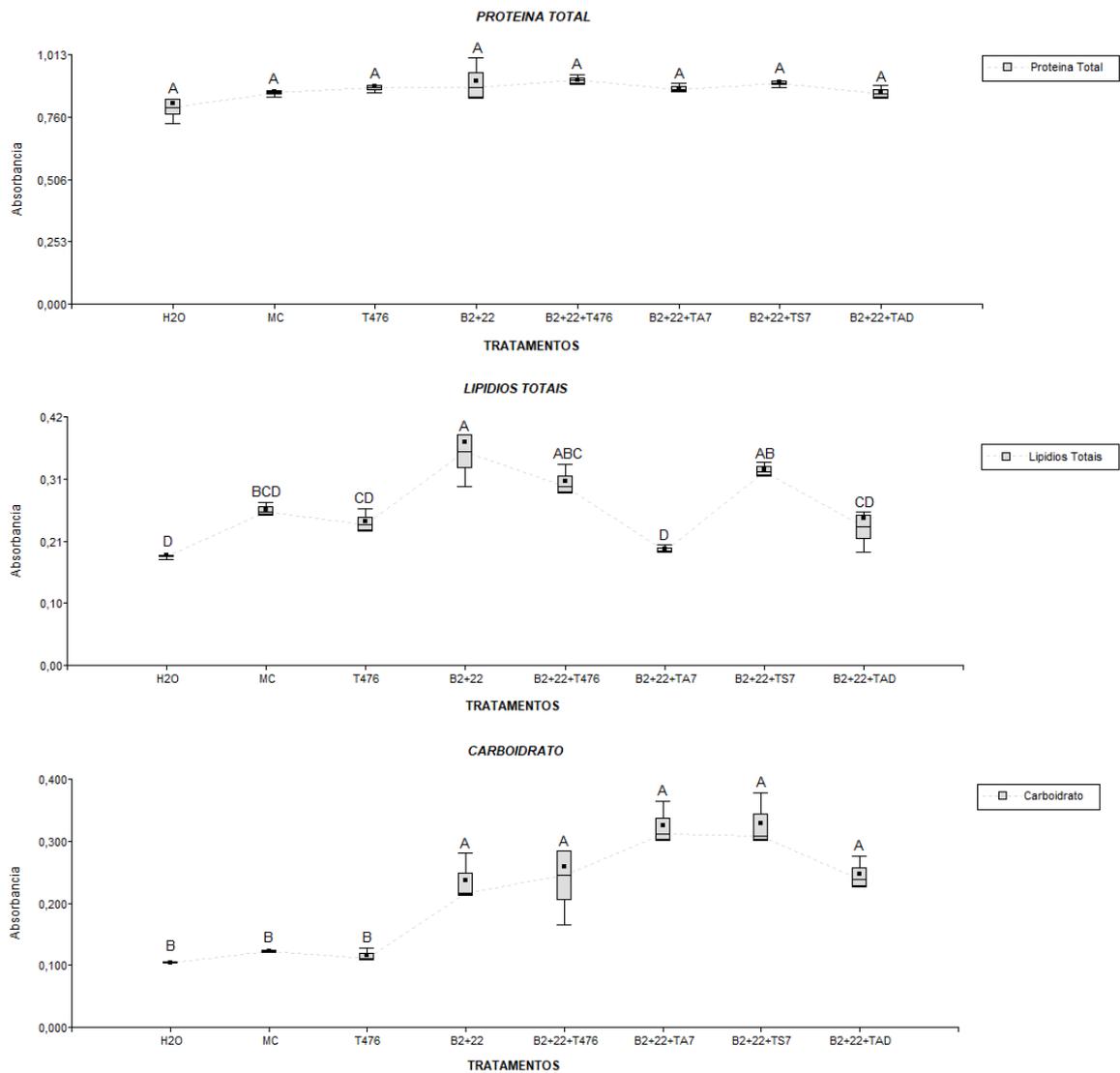


Figura 24. Estimativa do conteúdo de proteínas, lipídios e carboidrato total das mudas de tomate aos 30 dias de cultivo

Analisando os teores de açúcares totais (carboidrato), observa-se que os tratamentos contendo a inoculação combinada das bactérias apresentaram junto com os tratamentos englobando o consórcio microbiano as melhores médias, diferindo estatisticamente dos tratamentos T476, MC e H₂O. Ruiz et al. (2001) relataram incremento dos teores foliares de carboidratos solúveis até os 36 dias em laranja 'Washington Navel' [*C.sinensis*(L.) Osbeck], com posterior redução até os 90 dias.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Os resultados obtidos possibilitam concluir que todos os isolados bacterianos utilizados apresentaram uma alta compatibilidade com o *T. longibrachiatum* UENF-F467.

A interação mutualística entre os isolados bacterianos e o fungo *T. longibrachiatum* UENF-F467 revelaram um importante papel do consórcio microbiano na promoção de crescimento de plantas de tomate.

A interação mútua entre os isolados bacterianos e o fungo saprotrófico *T. longibrachiatum* UENF-F467 aumentou a aptidão ecológica da bactéria juntamente com o potencial benéfico para o crescimento da planta. Uma combinação adequada e entrega de bactéria-fungo benéficos compatíveis representam um caminho aberto para o enriquecimento biológico de tecnologias de substratos vegetais em sistemas agrícolas.

A interação mútua entre a bactéria colonizadora de microsfera e o fungo saprotrófico *T. longibrachiatum* UENF-F467 aumentou todos os parâmetros analisados das plantas de tomate, evidenciando potencial benéfico para o crescimento da planta.

O consórcio adequado de bactéria-fungo benéficos compatíveis representa um caminho aberto para uma produção sustentável.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acea, M.J., Moore, C.R., Alexander, M. (1988) Survival and growth of bacteria introduced into soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 20 (4): 509-515.
- Aguiar, K. P. (2012) Prospecção de bactérias promotoras do crescimento vegetal associadas a vermicompostos. CCTA. Campos dos Goytacazes: Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF, 101p.
- Ahmad, J. S., Baker, R. (1987) Competitive saprophytic ability and cellulolytic activity of rhizosphere-competent mutants of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*, 77(2): 358-362.
- Alvarenga, M. A. R. (2004) Origem, botânica e descrição da planta. Tomate: produção em campo e casa-de-vegetação e em hidroponia. Lavras: UFLA, 13-23.
- Andrews, J. H. (1992) Biological control in the phyllosphere. *Annual review of phytopathology*, 30(1): 603-635.
- Aquino, J. P. A. D., Macedo, F. B. D., Antunes, J. E. L., Figueiredo, M. D. V. B., Alcântara, F. D., Araujo, A. S. F. D. (2019) Bactérias endofíticas promotoras de crescimento em milho e sorgo. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 49.
- Araujo, F. F. D. (2008) Seed inoculation with *Bacillus subtilis*, formulated with oyster meal and growth of corn, soybean, and cotton. *Ciência e Agrotecnologia*, 32(2): 456-462.
- Arshad, M., Saleem, M., Hussain, S. (2007) Perspectives of bacterial ACC deaminase in phytoremediation. *TRENDS in Biotechnology*, 25(8): 356-362.

- Artursson, V., Finlay, R. D., Jansson, J. K. (2006) Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environmental microbiology*, 8(1): 1-10.
- Azarmi, R., Hajieghrari, B., Giglou, A. (2011) Effect of Trichoderma isolates on tomato seedling growth response and nutrient uptake. *African Journal of Biotechnology*, 10(31): 5850-5855.
- Azevedo, I. M. G. D., Alencar, R. M. D., Barbosa, A. P., Almeida, N. O. D. (2010) Study of growth and quality of marupá (Simarouba amara Aubl.) nursery seedlings. *Acta Amazonica*, 40(1): 157-164.
- Baldani, J. I., Salles, J. F., Olivares, F. L. (2002) Bactérias endofíticas como vetores de genes de resistencia a insetos. *Recursos genéticos e melhoramento-microrganismos*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 589-601.
- Baldani, J. I., Pot, B., Kirchhof, G., Falsen, E., Baldani, V. L. D., Olivares, F. L., Döbereiner, J. (1996) Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. Nov.; and classification of a Group of Clinical Isolates (EF Group 1) as *Herbaspirillum* species 3. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 46(3): 802-810.
- Baldani, J. I., Baldani, V. L. (2005) History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 77(3): 549-579.
- Baldotto, L. E. B., Olivares, F. L. (2008) Phylloepiphytic interaction between bacteria and different plant species in a tropical agricultural system. *Canadian Journal of Microbiology*, 54(11): 918-931.
- Ballhausen M-B, de Boer W. A (2016) Sapro-rizosfera: fluxo de carbono de fungos saprotróficos para bactérias que se alimentam de fungos. *Biologia e Bioquímica do Solo*, 102: 7-14.
- Barretti, P. B., Souza, R. M. D., Pozza, E. A. (2008) Bactérias endofíticas como agentes promotores do crescimento de plantas de tomateiro e de inibição in vitro de *Ralstonia solanacearum*. *Ciência e Agrotecnologia*, 32: 731-739.
- Battaglia, D., Bossi, S., Cascone, P., Digilio, M. C., Prieto, J. D., Fanti, P., Trotta, V. (2013) Tomato below ground–above ground interactions: *Trichoderma longibrachiatum* affects the performance of *Macrosiphum euphorbiae* and its natural antagonists. *Molecular plant-microbe interactions*, 26(10): 1249-1256.
- Becker, W. F., Wamser, A. F., Feltrim, A. L., Suzuki, A., Santos, J. P., Valmorbidia, J., Mueller, S. (2016) Sistema de produção integrada para o tomate tutorado em Santa Catarina. Florianópolis, SC: *Epagri*, 149 p.

- Beneduzi, A., Moreira, F., Costa, P. B., Vargas, L. K., Lisboa, B. B., Favreto, R., Passaglia, L. M. P. (2013) Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. *Applied Soil Ecology*, 63: 94-104.
- Beneduzi, A., Moreira, F., Costa, P. B., Vargas, L. K., Lisboa, B. B., Favreto, R., Passaglia, L. M. P. (2013) Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. *Applied Soil Ecology*, 63: 94-104.
- Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., Codon, A. C. (2004) Biocontrol mechanisms of Trichoderma strains. *International microbiology*, 7(4): 249-260.
- Björkman, T., Price, H. C., Harman, G. E., Ballerstein, J., Nielsen, P. (1994) 287 Improved performance of shrunken-2 sweet corn using trichoderm harzianum as a bioprotectant. *HortScience*, 29(5): 471b-471.
- Bortolin, G. S., Wiethan, M. M. S., Vey, R. T., Oliveira, J. C. P., Köpp, M. M., da Silva, A. C. F. (2019) Trichoderma na promoção do desenvolvimento de plantas de Paspalum regnellii Mez. *Revista de Ciências Agrárias*, 42(1): 135-145.
- Junior, G. M. B., Junior, A. F. C., Chagas, L. F. B., de Carvalho Filho, M. R., de Oliveira Miller, L., dos Santos, G. R. (2017) Controle biológico de fitopatógenos por Bacillus subtilis in vitro. *Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)*, 7(3): 45-51.
- Bray, Elizabeth A. (2000) Responses to abiotic stresses. *Biochemistry and molecular biology of plants*, p. 1158-1203.
- Brissette, J. C., Barnes, B. V. (1984) Comparisons of phenology and growth of Michigan and western North American sources of Populus tremuloides. *Canadian Journal of Forest Research*, 14(6): 789-793.
- Brotman, Yariv et al. (2013) Trichoderma-plant root colonization: escaping early plant defense responses and activation of the antioxidant machinery for saline stress tolerance. *PLoS pathogens*, v. 9, n. 3, p. e1003221.
- Bull, C. T., Shetty, K. G., Subbarao, K. V. (2002) Interactions between myxobacteria, plant pathogenic fungi, and biocontrol agents. *Plant Disease*, 86(8): 889-896.
- Bullied JW, Buss WTJ and Vessey KJ (2002) *Bacillus cereus* UW85 inoculation effects on growth, nodulation, and N accumulation in grain legumes: Field studies. *Canadian Journal of Plant Science*, 82:291-298.
- Campanharo M; Rodrigues JJV; Junior Mal; Espindula MC; Costa JVT. (2006) Características físicas de diferentes substratos para produção de mudas de tomateiro. *Caatinga*, 19: 40-145.

- Canellas, L. P., Balmori, D. M., Medici, L. O., Aguiar, N. O., Campostrini, E., Rosa, R. C. C., Façanha, A. R., Olivares, F. L. (2013) A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). *Plant and Soil*, 366: 119-132.
- Canuto, E. L. (2003) *Seleção de bactérias diazotróficas endofíticas para uso com insumo biológico em plantas de cana-de-açúcar oriundas de sementes*. Tese de Doutorado. Seropédica – RJ, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ, 70p.
- Carvalho Filho, M. R., de Mello, S. C. M., dos Santos, R. P., Menêzes, J. E. (2008) Avaliação de isolados de *Trichoderma* na promoção de crescimento, produção de ácido indolacético in vitro e colonização endofítica de mudas de eucalipto. *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)*, 16p.
- Casillas, J. C., Londoño, J., Guerrero, H., Buitrago, L. A. (1986) Análisis cuantitativo de la aplicación de cuatro bioestimulantes en el cultivo del rabano (*Raphanus sativus* L.). *Acta Agronomica*, 36(2): 185-195.
- Castiglioni, P., Warner, D., Bensen, R. J., Anstrom, D. C., Harrison, J., Stoecker, M., Navarro, S. (2008) Bacterial RNA chaperones confer abiotic stress tolerance in plants and improved grain yield in maize under water-limited conditions. *Plant physiology*, 147(2): 446-455.
- Chagas Jr, A. F., Gomes, F. L., Souza, M. C., Martins, A. L. L., Oliveira, R. S. de Giongo, M., Chagas, L. F. B. (2021) *Trichoderma* como promotor de crescimento de mudas de eucaliptos. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 9(1):060-072.
- Junior, A. F. C., Chagas, B., Colonia, B. S. O., de Oliveira Miller, L. (2019) *Trichoderma asperellum* (UFT201) functions as a growth promoter for soybean plant. *African Journal of Agricultural Research*, 14(33): 1772-1777.
- Chagas, L. F. B., Junior, A. F. C., & de Castro, H. G. (2017) Phosphate solubilization capacity and indole acetic acid production. *Brazilian Journal of Agriculture*, 92(2): 176-185.
- Chagas, L. F., Orozco, B. S., Rodrigues, G. (2017) Rice growth influence by *Trichoderma* spp. with natural phosphate fertilization under greenhouse conditions. *International Journal of Development Research*, 7:13147-13152.
- Chagas, M. F., Bordonal, R. O., Cavalett, O., Carvalho, J. L. N., Bonomi, A., La Scala Jr, N. (2016) Environmental and economic impacts of different sugarcane production systems in the ethanol biorefinery. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 10(1): 89-106.
- Chanway, C. P. (1997) Inoculation of tree roots with plant growth promoting soil bacteria: an emerging technology for reforestation. *Forest Science*, 43(1), 99-112.

- Chávez, D., Pereira, G., Machuca, Á. (2014) Estimulación del crecimiento en plántulas de *Pinus radiata* utilizando hongos ectomicorrícicos y saprobios como biofertilizantes. *Bosque (Valdivia)*, 35(1): 57-63.
- Chowdappa, P., Kumar, S. M., Lakshmi, M. J., 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.
- Ciccillo, F., Fiore, A., Bevivino, A., Dalmastrì, C., Tabacchioni, S., Chiarini, L. (2002) Effects of two different application methods of *Burkholderia ambifaria* MCI 7 on plant growth and rhizospheric bacterial diversity. *Environmental Microbiology*, 4(4), 238-245.
- Clayton, G. W., Rice, W. A., Lupwayi, N. Z., Johnston, A. M., Lafond, G. P., Grant, C. A., Walley, F. (2004) Inoculant formulation and fertilizer nitrogen effects on field pea: Nodulation, N₂ fixation and nitrogen partitioning. *Canadian Journal of Plant Science*, 84(1), 79-88.
- Conceição, P. M. D., Vieira, H. D., Canellas, L. P., Marques Júnior, R. B., Olivares, F. L. (2008) Recobrimento de sementes de milho com ácidos húmicos e bactérias diazotróficas endofíticas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43: 545-548.
- Cong, P. T., Dung, T. D., Hien, T. M., Hien, N. T., Choudhury, A. T., Kecskes, M. L., Kennedy, I. R. (2009) Inoculant plant growth-promoting microorganisms enhance utilisation of urea-N and grain yield of paddy rice in southern Vietnam. *European Journal of Soil Biology*, 45(1): 52-61.
- Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Cortés-Penagos, C., López-Bucio, J. (2009) *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 149(3): 1579-1592.
- Costa, L. A. D. M., Costa, M. S. S. D. M., Pereira, D. C., Bernardi, F. H., Maccari, S. (2013) Avaliação de substratos para a produção de mudas de tomate e pepino. *Revista Ceres*, 60(5): 675-682.
- Costa, N. D., Araújo, J. F., Santos, C. A. F., de Resende, G. M., de Lima, M. A. C. (2008) Desempenho de cultivares de cebola em cultivo orgânico e tipos de solo no Vale do São Francisco. *Horticultura Brasileira*, 26: 476-480.
- Costa, N. De L.; Daros, E.; De Moraes, A. (2011) Utilização de bioestimulantes na cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) *PUBVET*, 5, :Art. 1137.
- Da Silva, J. C., Torres, D. B., Lustosa, D. C., De Filippi, M. C. C., Da Silva, G. B. (2012a). Rice sheath blight biocontrol and growth promotion by *Trichoderma* isolates from the Amazon. *Embrapa Arroz e Feijão-Artigo em periódico indexado (ALICE)* 8p.

- Da Silva, M. F., de Souza Antônio, C., de Oliveira, P. J., Xavier, G. R., Rumjanek, N. G., de Barros Soares, L. H., Reis, V. M. (2012b) Survival of endophytic bacteria in polymer-based inoculants and efficiency of their application to sugarcane. *Plant and soil*, 356(1), 231-243.
- Da Silva, R. R., Rodrigues, L. U., de Freitas, G. A., de Melo, A. V., do Nascimento, I. R., D'Andréa, A. F. (2012c) Influência de casca de arroz carbonizada em diferentes substratos na qualidade de mudas de tomateiro. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 7, 803-809.
- Dartora, J., Guimarães, V. F., Marini, D., Sander, G. (2013) Adubação nitrogenada associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do milho. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 17, 1023-1029.
- Melo, I. S. (1998) Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas: descrição e potencial de uso na agricultura. *Embrapa Meio Ambiente-Capítulo em livro científico (ALICE)* 31p.
- Desai, S. A. (2017) Isolation and characterization of gibberellic acid (GA3) producing rhizobacteria from sugarcane roots. *Bioscience Discovery*, 8(3): 488-494.
- Dey, R. K. K. P., Pal, K. K., Bhatt, D. M., Chauhan, S. M. (2004) Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiological research*, 159(4): 371-394.
- Diaz, P. A. E. (2018) *Bacillus* spp. como promotores de crescimento na cultura do algodão. Dissertação de mestrado- Jaboticabal – SP, Universidade Estadual Paulista - UNESP, 61 p.
- Dobereiner, J. (1995) Isolation and identification of aerobic nitrogen-fixing bacteria from soil and plants. *Methods in Applied Soil Microbiology and Biotechnology*, p. 134-141.
- Domenech, J., Reddy, M. S., Kloepper, J. W., Ramos, B., Gutierrez-Manero, J. (2006) Combined application of the biological product LS213 with *Bacillus*, *Pseudomonas* or *Chryseobacterium* for growth promotion and biological control of soil-borne diseases in pepper and tomato. *BioControl*, 51(2): 245-258.
- Santos, S. T., Oliveira, F. D. A., Costa, J. D. M., Neta, M. D. S., Alves, R. D. C., Costa, L. P. (2016) Seedling quality in tomato cultivars for nutrient solutions of increasing concentration. *Agro@ambiente on-line*, 10(4): 326-333.
- Eloy, E., Caron, B. O., Schmidt, D., Behling, A., Schwers, L., Elli, E. F. (2013) Avaliação da qualidade de mudas de *Eucalyptus grandis* utilizando parâmetros morfológicos. *Floresta*, 43(3): 373-384.
- Esitken, A., Karlidag, H., Ercisli, S., Turan, M., Sahin, F. (2003) The effect of spraying a growth promoting bacterium on the yield, growth and nutrient

- element composition of leaves of apricot (*Prunus armeniaca* L. cv. Hacıhaliloglu). *Australian Journal of Agricultural Research*, 54(4): 377-380.
- Esquivel-Cote, R (2007) Efecto de la inoculación con *Azospirillum* sp., y fertilización nitrogenada en el crecimiento y producción de jitomate (*Solanum lycopersicum* Mill.). *Agro Productividad*, 10: n. 7.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Data base Faostat – Agriculture, Roma: FAO (2019). Available in: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Acessado em 20/12/2020
- Ferreira, P. A., Ferraz, S., Lopes, E. A., Freitas, L. G. (2008) Parasitismo de ovos de *Meloidogyne exigua* por fungos nematófagos e estudo da compatibilidade entre os isolados fúngicos. *Revista Trópica–Ciências Agrárias e Biológicas*, 2(3): 15-21.
- Filgueira, F. A. R. (2008) Novo manual de olericultura: Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 3.ed. Viçosa: UFV, 421p.
- Silveira, K. C. (2018). Avaliação agrônômica do tomateiro em resposta à inoculação de bactérias promotoras de crescimento de plantas. Dissertação de mestrado – Florestal - MG, Universidade Federal de Viçosa - UFV, 78p.
- Fontenelle, A. D. B., Guzzo, S. D., Lucon, C. M. M., Harakava, R. (2011) Growth promotion and induction of resistance in tomato plant against *Xanthomonas euvesicatoria* and *Alternaria solani* by *Trichoderma* spp. *Crop Protection* 30: 1492-1500.
- Fortes, F. D. O., Silva, A. C. F. D., Almança, M. A. K., Tedesco, S. B. (2007) Root induction from microcutting of an *Eucalyptus* sp. clone by *Trichoderma* spp. *Revista Árvore*, 31: 221-228.
- Fortes, F. D. O., Silva, A. C. F. D., Almança, M. A. K., Tedesco, S. B. (2007) Root induction from microcutting of an *Eucalyptus* sp. clone by *Trichoderma* spp. *Revista Árvore*, 31: 221-228.
- Giordano, L. de B.; RIBEIRO, CS da C. (200) Origem, botânica e composição química do fruto. Tomate para processamento industrial. Brasília: *Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia/Embrapa hortaliças*, 345p.
- Glick, Bernard R. (2012) Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012: 1-16.
- Gomes, E. A.; Silva, U. C.; Paiva, C. A. O.; Lana, U. G. P.; Santos, V. L.. (2016) Microrganismos Promotores do Crescimento de Plantas. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. *Embrapa Documentos 208 para Transferência de Tecnologia/Embrapa* 53p.
- Gomes, J. M.; (2001) Parâmetros morfológicos na avaliação da qualidade de mudas de *Eucalyptus grandis*, produzidas em diferentes tamanhos de tubete

- e de dosagens de N - P - K. Tese (Doutorado em Ciência Florestal), Viçosa – MG, Universidade Federal de Viçosa - UFV, 112 p.
- Gomes, J. M., & Paiva, H. D. (2004), HN de. Viveiros florestais: propagação sexuada. 1 ed. Viçosa: UFV. Livraria UFV – Série Didática, 116p.
- Gondim, J. A. M., Moura, M. D. F. V., Dantas, A. S., Medeiros, R. L. S., Santos, K. M. (2005) Composição centesimal e de minerais em cascas de frutas. *Food Science and Technology*, 25: 825-827.
- Govindarajan, M., Balandreau, J., Muthukumarasamy, R., Revathi, G, Lakshminarasimhan, C. (2006) Improved yield of micropropagated sugarcane following inoculation by endophytic *Burkholderia vietnamiensis*. *Plant and Soil*, 280(1): 239-252.
- Guimarães VF; Echer MM; Minami K. (2002) Métodos de produção de mudas, distribuição de matéria seca produtividade de plântulas de beterraba. *Horticultura Brasileira* 20: 505-509.
- Gupta, K. J., Mur, L. A., Brotman, Y. (2014) *Trichoderma asperelloides* suppresses nitric oxide generation elicited by *Fusarium oxysporum* in *Arabidopsis* roots. *Molecular plant-microbe interactions*, 27(4): 307-314.
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W. F., Kloepper, J. W. (1997) Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian journal of microbiology*, 43(10): 895-914.
- Hameeda, B., Harini, G., Rupela, O. P., Wani, S. P., Reddy, G. (2008) Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. *Microbiological research*, 163(2): 234-242.
- Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., van Elsas, J. D. (2008) Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in microbiology*, 16(10): 463-471.
- Harman, G. E. (1998) Potential and existing uses of *Trichoderma* and *Gliocladium* for plant disease control and plant growth enhancement. *Trichoderma and gliocladium*, 2: 229-265.
- Harman, G. E., Petzoldt, R., Comis, A., Chen, J. (2004) Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology*, 94(2): 147-153.
- Harman, G. E. (2006) Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 96(2): 190-194.
- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I., Monte, E. (2012) Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*, 158(1): 17-25.

- Hermosa, R., Rubio, M. B., Cardoza, R. E., Nicolás, C., Monte, E., Gutiérrez, S. (2013). The contribution of *Trichoderma* to balancing the costs of plant growth and defense. *International Microbiology*, 16(2), 69-80.
- Higuti, A. R. O., Salata, A. D. C., Godoy, A. R., Cardoso, A. I. I. (2010) Produção de mudas de abóbora com diferentes doses de nitrogênio e potássio. *Bragantia*, 69: 377-380.
- Higuti, A. R. O., Salata, A. D. C., Godoy, A. R., Cardoso, A. I. I. (2010) Produção de mudas de abóbora com diferentes doses de nitrogênio e potássio. *Bragantia*, 69: 377-380.
- Holmes, K. A., Schroers, H. J., Thomas, S. E., Evans, H. C., Samuels, G. J. (2004) Taxonomy and biocontrol potential of a new species of *Trichoderma* from the Amazon basin of South America. *Mycological Progress*, 3(3): 199-210.
- Huergo, L. F.; Monteiro, R. A.; Bonatto, A. C.; Rigo, L. U.; Steffens, M. B. R.; Cruz, L. M.; Chubatsu, L. S.; Souza, E. M.; Pedrosa, F. O. (2008) Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. In: Cassán, F. D.; Garcia de Salamone, I. (Ed.). *Azospirillum sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina*. Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología, p. 17-35.
- IBGE. Tomate: Produtividade de 2016/2017. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 03/11/2020.
- Jayasinghearachchi, H. S., Seneviratne, G. (2004) A bradyrhizobial-*Penicillium* spp. biofilm with nitrogenase activity improves N₂-fixing symbiosis of soybean. *Biology and Fertility of Soils*, 40(6): 432-434.
- Jindapunnapat, K. Chinnasri, B. K E, S. (2013) Biological control of root-knot nematodes (*Meloidogyne enterolobii*) in guava by the fungus *Trichoderma harzianum*. *Journal of Developments in Sustainable Agriculture*, 8: 110-118.
- John, R. P. (2010) Mycoparasitic *Trichoderma viride* as a biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. adzuki and *Pythium arrhenomanes* and as a growth promoter of soybean. *Crop protection*, 29:1452-1459.
- Jorquera, M. A., Crowley, D. E., Marschner, P., Greiner, R., Fernández, M. T., Romero, D., De La Luz Mora, M. (2011) Identification of β -propeller phytase-encoding genes in culturable *Paenibacillus* and *Bacillus* spp. from the rhizosphere of pasture plants on volcanic soils. *FEMS microbiology ecology*, 75(1): 163-172.
- Junior, F. C. J. A.; (2019) Efficiency of *Trichoderma asperellum* UFT 201 as plant growth promoter in soybean. *African Journal of Agricultural Research*, 14:263-271.
- Kershaw, Michael J.; T, Nicholas J. (1998) Hydrophobins and repellents: proteins with fundamental roles in fungal morphogenesis. *Fungal Genetics and Biology*23:18-33.

- Kilian, M., Steiner, U., Krebs, B., Junge, H., Schmiedeknecht, G., & Hain, R. (2000). FZB24® *Bacillus subtilis*—mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, v. 1, n. 00, p. 1, 2000.
- Kruasuwan, W., Thamchaipenet, A. (2018) 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase-producing endophytic diazotrophic *Enterobacter* sp. EN-21 modulates salt–stress response in sugarcane. *Journal of Plant Growth Regulation*, 37(3): 849-858.
- Lanna Filho, R., Ferro, H. M., Pinho, R. D. (2010) Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. *Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas*, 4(2): 12-20.
- Lee, S., Flores-Encarnacion, M., Contreras-Zentella, M., Garcia-Flores, L., Escamilla, J. E., Kennedy, C. (2004) Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome c biogenesis genes. *Journal of Bacteriology*, 186(16): 5384-5391.
- Li, R. X., Cai, F., Pang, G., Shen, Q. R., Li, R., Chen, W. (2015) Solubilisation of phosphate and micronutrients by *Trichoderma harzianum* and its relationship with the promotion of tomato plant growth. *PLoS One*, 10(6): e0130081.
- Li, H. Q., Li, X. J., Wang, Y. L., Zhang, Q., Zhang, A. L., Gao, J. M., Zhang, X. C. (2011) Antifungal metabolites from *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus in *Ginkgo biloba*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 4(39): 876-879.
- Lira-Cadete, L., Barbosa de Farias, A. R., de Souza Ramos, A. P., da Costa, D. P., Freire, F. J., Kuklinsky-Sobral, J. (2012) Genetic variability of sugarcane-associated diazotrophic bacteria capable of inorganic phosphate solubilizing. *Bioscience Journal*, 28(1): 122-129.
- Lopes, C. (2005) Introdução geral. In: Lopes, C. A. e Ávila, A. C. (Eds.). *Doenças do Tomateiro*. Brasília: Embrapa Hortaliças, p.11-15.
- Lopes, V. R., Bessalho Filho, J. C., Figueiredo, G. G. O., de Oliveira, R. A., Daros, E. (2019) Interaction between sugarcane families and plant growth-promoting bacteria in two crop cycles. *Semina: Ciências Agrárias*, 40(2): 527-538.
- Lopes, V. R., Bessalho Filho, J. C., Figueiredo, G. G. O., de Oliveira, R. A., Daros, E. (2019) Interaction between sugarcane families and plant growth-promoting bacteria in two crop cycles. *Semina: Ciências Agrárias*, 40(2): 527-538.
- Lucy, M.; REED, E.; GLICK, Bernard R. (2004) Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 86:1-25.
- Machado, D. F. M., Parzianello, F. R., da Silva, A. C. F., Antonioli, Z. I (2012) *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. *Revista de Ciências Agrárias*, 35: 274-288.

- Mallon, C. A., Van Elsas, J. D., Salles, J. F. (2015) Microbial invasions: the process, patterns, and mechanisms. *Trends in microbiology*, 23(11): 719-729.
- Malusà, E.; Pinzari, F.; Canfora, L. (2016) Efficacy of biofertilizers: challenges to improve crop production. *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity: Vol. 2: Functional Applications*, p. 17-40.
- Mariano, R. D. L. R., da Silveira, E. B., de Assis, S. M. P., Gomes, A. M. A., Nascimento, A. R. P., Donato, V. M. T. S. (2004) Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*, 1:89-111.
- Marim, B. G., Silva, D. J. H. D., Guimarães, M. D. A., Belfort, G. (2005) Sistemas de tutoramento e condução do tomateiro visando produção de frutos para consumo in natura. *Horticultura Brasileira*, 23(4): 951-955.
- Marques, M.O.: Marques, T.A.: Tasso Júnior, L.C. (2001) Tecnologia do Açúcar. Produção e Industrialização da Cana-de-açúcar. Jaboticabal:, Funep, 166p.
- Marques Júnior, R. B., Canellas, L. P., Silva, L. G. D., Olivares, F. L. (2008). Promoção de enraizamento de microtoletes de cana-de-açúcar pelo uso conjunto de substâncias húmicas e bactérias diazotróficas endofíticas. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 32:1121-1128.
- Martínez, C., Espinosa-Ruiz, A., Prat, S. (2016) Gibberellins and plant vegetative growth. *Annual Plant Reviews*, 49:285-322.
- Martínez-Viveros, O., Jorquera, M. A., Crowley, D. E., Gajardo, G. M. L. M., Mora, M. L. (2010) Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *Journal of soil science and plant nutrition*, 10(3): 293-319.
- Medzon, E. L., Brady, M. L. (1969) Direct measurement of acetylcysteine in living protist cells. *Journal of Bacteriology*, 97:402-415.
- Mertz, L. M., Henning, F. A., Zimmer, P. D. (2009) Bioprotectors and chemical fungicides in the treatment of soybean seeds. *Ciência Rural*, 39:13-18.
- Meyer, Susan LF; Roberts, Daniel P. (2002) Combinations of biocontrol agents for management of plant-parasitic nematodes and soilborne plant-pathogenic fungi. *Journal of nematology*, v. 34, n. 1, p. 1.
- Monte, Enrique; Bettiol, Wagner; Hermosa, Rosa. (2019) Trichoderma e seus mecanismos de ação para o controle de doenças de plantas. *Trichoderma: uso na agricultura. Brasília: Embrapa*, p. 181-199.
- Nascimento, F. X. I. (2018) Promoting plant growth using ACC deaminase-producing bacteria: insights into plant-bacterial interactions and agricultural and biotechnological applications. Tese (Doutorado em Biotecnologia e

- Biociências). Florianópolis - SC, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, 441p.
- Nieto-Jacobo, M. F., Steyaert, J. M., Salazar-Badillo, F. B., Nguyen, D. V., Rostás, M., Braithwaite, M., Mendoza-Mendoza, A. (2017). . Environmental growth conditions of *Trichoderma* spp. affects indole acetic acid derivatives, volatile organic compounds, and plant growth promotion. *Frontiers in plant science*, p. 102, 2017.
- Mishra, J., Prakash, J., Arora, N. K. (2016) Role of beneficial soil microbes in sustainable agriculture and environmental management. *Climate Change and Environmental Sustainability*, 4:137-149.
- Oliveira, G. R. F., Silva, M. S., Marciano, T. Y. F., Proença, S. L., Sá, M. E. (2016) Crescimento inicial do feijoeiro em função do vigor de sementes e inoculação com *Bacillus subtilis*. *Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas*, 10(4): 439-448.
- Olivares, F. L., Aguiar, N. O., Rosa, R. C. C., Canellas, L. P. (2015) Substrate biofortification in combination with foliar sprays of plant growth promoting bacteria and humic substances boosts production of organic tomatoes. *Scientia Horticulturae*, 183:100-108.
- Olivares, F. L., Busato, J. G., de Paula, A. M., da Silva Lima, L., Aguiar, N. O., & Canellas, L. P. (2017) Plant growth promoting bacteria and humic substances: crop promotion and mechanisms of action. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 4:1-13.
- Oliveira, A. G., Junior, A. F. C., dos Santos, G. R., Miller, L. O., & Chagas, L. F. B. (2012) Potencial de solubilização de fosfato e produção de AIA por *Trichoderma* spp. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, v. 7, n. 3, p. 26.
- De Oliveira, A. L. M., Urquiaga, S., & Baldani, J. I. (2003) Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal. *Embrapa Agrobiologia-Documentos (INFOTECA-E)*.
- Oliveira, C. A., Alves, V. M. C., Marriel, I. E., Gomes, E. A., Scotti, M. R., Carneiro, N. P., ... Sá, N. M. H. (2009) Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(9): 1782-1787.
- Oteino, N.; Lally, R. D.; Kiwanuka, S.; Lloyd, A.; Ryan, D.; Germaine, K. J., DOWLING, D. N. (2015) Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Frontiers in Microbiology*, 6:1-9.
- Paungfoo-Lonhienne, C., Lonhienne, T. G. A., Yeoh, Y. K., Donose, B. C., Webb, R. I., Parsons, J.; Liao, W.; (2016) Crosstalk between sugarcane and a plantgrowth promoting *Burkholderia* species. *Scientific Reports*, 6:1-14.

- Peralta, I. E., Spooner, D. M. (2007) History, origin and early cultivation of tomato (*Solanaceae*). *Genetic Improvement of Solanaceous Crops*, 2:1-27.
- Pereira, W., Leite, J. M., Hipólito, G. D. S., Santos, C. L. R. D., Reis, V. M. (2013) Acúmulo de biomassa em variedades de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes estirpes de bactérias diazotróficas. *Revista Ciência Agronômica*, 44:363-370.
- Perin, L. (2003) Ecologia e diversidade de isolados de *Gluconacetobacter diazotrophicus* associados à cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). Seropédica, RJ. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo) – Seropédica – RJ, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ, 63 p.
- Phillips, K. A., Skirpan, A. L., Liu, X., Christensen, A., Slewinski, T. L., Hudson, C., McSteen, P. (2011) vanishing tassel2 encodes a grass-specific tryptophan aminotransferase required for vegetative and reproductive development in maize. *The Plant Cell*, 23(2): 550-566.
- Pieterse, C. M., van der Does, A., Zamioudis, C., Leon Reyes, H. A., Van Wees, S. C. (2012) Hormonal modulation of plant immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28:489-521.
- Quadros, P. D. D. (2009) Inoculação de *Azospirillum* spp. em sementes de genótipos de milho cultivados no Rio Grande do Sul. Dissertação de Mestrado em Ciências do solo. Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre. 63p.
- Raja, P., Uma, S., Gopal, H., Govindarajan, K. (2006) Impact of bio inoculants consortium on rice root exudates, biological nitrogen fixation and plant growth. *Journal of Biological Sciences*, 6:815-823.
- Reis Junior, F. B. D., Silva, L. G. D., Reis, V., Döbereiner, J. (2000) Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 35: 985-994.
- Reis, R. J., Alves, A. F., dos Santos, P. H. D., Aguiar, K. P., da Silveira, S. F., Canellas, L. P., Olivares, F. L. (2020). Mutualistic interaction with *Trichoderma longibrachiatum* UENF-F476 boosted plant growth-promotion of *Serratia marcescens* UENF-22Gl. *bioRxiv*, p. 2020.08. 24.265587.
- Rinaudi, L., Fujishige, N. A., Hirsch, A. M., Banchio, E., Zorreguieta, A., Giordano, W. (2006) Effects of nutritional and environmental conditions on *Sinorhizobium meliloti* biofilm formation. *Research in microbiology*, 157(9): 867-875.
- Rodrigues, E. T., Leal, P. A., Costa, E., de Paula, T. S., Gomes, V. D. A. (2010) Produção de mudas de tomateiro em diferentes substratos e recipientes em ambiente protegido. *Horticultura Brasileira*, 28(4): 483-488.
- Roesch, L. F. W., Olivares, F. L., Pereira Passaglia, L. M., Selbach, P. A., de Sá, E. L. S., de Camargo, F. A. O. (2006) Characterization of diazotrophic bacteria

- associated with maize: effect of plant genotype, ontogeny and nitrogen-supply. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(9): 967-974.
- Roesti, D., Gaur, R., Johri, B. N., Imfeld, G., Sharma, S., Kawaljeet, K., Aragno, M. (2006) Plant growth stage, fertiliser management and bio-inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria affect the rhizobacterial community structure in rain-fed wheat fields. *Soil Biology and Biochemistry*, 38:1111-1120.
- Rudnick, M. B., Van Veen, J. A., & De Boer, W. (2015) Baiting of rhizosphere bacteria with hyphae of common soil fungi reveals a diverse group of potentially mycophagous secondary consumers. *Soil Biology and Biochemistry*, 88:73-82.
- Ruiz, R., Garcia-Luis, A., Monerri, C., Guardiola, J. L. (2001) Carbohydrate availability in relation to fruitlet abscission in Citrus. *Annals of Botany*, 87(6): 805-812.
- Russo, R. O., Berlyn, G. P. (1992) Vitamin-humic-algal root biostimulant increases yield of green bean. *HortScience*, 27:847-847.
- Saharan, B. S., Nehra, V. (2011) Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Science and Medical Research*, v. 21, n. 1, p. 30, 2011.
- Sahu, P. K., & Brahma Prakash, G. P. (2016). Formulations of biofertilizers—approaches and advances. *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity: Vol. 2: Functional Applications*, p. 179-198.
- Saia, S., Aissa, E., Luziatelli, F., Ruzzi, M., Colla, G., Ficca, A. G., Roupheal, Y. (2020) Growth-promoting bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi differentially benefit tomato and corn depending upon the supplied form of phosphorus. *Mycorrhiza*, 30(1): 133-147.
- Saito, L. R., Sales, L. L. S. R., Martinckoski, L., Royer, R., Ramos, M. S. D., Reffatti, T. (2011) Aspectos dos efeitos do fungo *Trichoderma* spp. no biocontrole de patógenos de culturas agrícolas. *Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias*, 2(3): 203-216.
- Sala, V. M. R., Freitas, S. D. S., Silveira, A. P. D. D. (2007) Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and diazotrophic bacteria in wheat plants. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42:1593-1600.
- Samuels, G. J. (2006) *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology*, 96(2): 195-206.
- San-Martín-Hernández, C., Trejo-Téllez, L. I., Volke-Haller, V. H., Saucedo-Veloz, C., García, P. S., Gómez-Merino, F. C., Escalante-Estrada, J. A. (2016) Nitrogen and potassium nutrition differentially affect tomato biomass and growth. *Interciencia*, 41:60-66.

- dos Santos Silva, C., Tenório, F. A., da Silva, J. M., Celestino, É. L. F. G., de Araújo, R. G. V., de Lima, J. R. B., dos Santos, T. M. C. (2018) Solubilização de fosfatos inorgânicos por bactérias endofíticas isoladas de maracujá amarelo (*Passiflora edulis Sims f. flavicarpa*). *Revista Craibeiras de Agroecologia*, v. 1, n. 1, 2018.
- dos Santos, R. M., Diaz, P. A. E., Lobo, L. L. B., Rigobelo, E. C. (2020) Use of plant growth-promoting rhizobacteria in maize and sugarcane: Characteristics and applications. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, v. 4, p. 136.
- Santos, R. M., Diaz, P. A. E., Lobo, L. L. B., Rigobelo, E. C. (2020) Use of plant growth-promoting rhizobacteria in maize and sugarcane: Characteristics and applications. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, v. 4, p. 136.
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., Glick, B. R. (2016) Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological research*, v. 183, p. 92-99.
- Sathya, Arumugam; Vijayabharathi, Rajendran; Gopalakrishnan, Subramaniam. Soil microbes: the invisible managers of soil fertility. *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity: Vol. 2: Functional Applications*, p. 1-16.
- Seneviratne, G., Jayasinghearachchi, H. S. (2003) Mycelial colonization by bradyrhizobia and azorhizobia. *Journal of Biosciences*, 28(2): 243-247.
- 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.
- Shin, W., Islam, R., Benson, A., Joe, M. M., Kim, K., Gopal, S., Sa, T. (2016) Role of diazotrophic bacteria in biological nitrogen fixation and plant growth improvement. *Korean Journal of Soil Science and Fertilizer*, 49(1): 17-29.
- Shoresh, M., Harman, G. E., Mastouri, F. (2010) Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual review of phytopathology*, 48:21-43.
- Silva DJH; Fontes P.C.R; Mizubuti E.S.G; Picanço M.C. (2007) Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). In: Paula Júnior de T.J; Venzon M (Eds.). *101 CULTURAS: Manual de tecnologias agrícolas*. Belo Horizonte: EPAMIG. p. 735– 750.
- Silva, J. R. C., Souza, R. M. D., Zacarone, A. B., Silva, L. H. C. P. D., & Castro, A. M. D. S. (2008) Bactérias endofíticas no controle e inibição in vitro de *Pseudomonas syringae* pv tomato, agente da pinta bacteriana do tomateiro. *Ciência e Agrotecnologia*, 32:1062-1072.
- Silva, C., Brigida, A., Taniguchi, C., Pinto, G. (2019) Uso do *Trichoderma* na cultura da banana. *Trichoderma USO NA AGRICULTURA*. 1.ed. Brasília – DF. Embrapa, p. 433- 444.

- Silva, Michelangelo, D. O. S., Fernando, J. F., Jlia, K. S., Emdio, C. A. D. O., Maria, B. G. D. S. F., Valria, X. D. O. A. (2016) Bacteria associated with sugarcane in Northeastern Brazil. *African Journal of Microbiology Research*, 10:1586-1594.
- Silva, Marinete Flores da. Uso de inoculante polimérico contendo bactérias diazotróficas na cultura da cana-de-açúcar. (2009). Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo) - Seropédica – RJ - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ, 91 p.
- Singh, H., Reddy, M. S. (2011) Effect of inoculation with phosphate solubilizing fungus on growth and nutrient uptake of wheat and maize plants fertilized with rock phosphate in alkaline soils. *European Journal of Soil Biology*, 47:30-34.
- Söderström, B. E. (1977). Vital staining of fungi in pure cultures and in soil with fluorescein diacetate. *Soil Biology and Biochemistry*, 9: 59-63.
- Souza, E. G. F., Barros Júnior, A. P., Silveira, L. M. D., Santos, M. G. D., Silva, E. F. D. (2013) Emergência e desenvolvimento de mudas de tomate IPA 6 em substratos, contendo esterco ovino. *Revista Ceres*, 60(6): 902-907.
- Souza, P. D., Novello, D., Almeida, J. M., Quintiliano, D. A. (2008) Análise sensorial e nutricional de torta salgada elaborada através do aproveitamento alternativo de talos e cascas de hortaliças. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, 18(1): 55-60.
- Souza, V. C. D., Silva, R. A. D., Cardoso, G. D., Barreto, A. F. (2006) Estudos sobre fungos micorrízicos. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 10(3): 612-618.
- Steenhoudt, O., Vanderleyden, J. (2000) Azospirillum, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS microbiology reviews*, 24(4): 487-506.
- Taiz, L. e Zeiger, E. (2004) - Fisiologia vegetal. Porto Alegre: Artmed, 719 p.
- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., Murphy, A. (2017) Fisiologia e desenvolvimento vegetal. 6.ed. Porto Alegre *Artmed Editora*.888p
- Thilgavathi R, Saravanakumar D, Ragupathi N, Samiyappan R (2007) Integration of biocontrol agents for the management of dry root rot (*Macrophomina phaseolina*) disease in greengram. *Phytopathologia Mediterranea* 46,2,157–167.
- Thonar, C., Lekfeldt, J. D. S., Cozzolino, V., Kundel, D., Kulhánek, M., Mosimann, C., ... Mäder, P. (2017) Potential of three microbial bio-effectors to promote maize growth and nutrient acquisition from alternative phosphorous fertilizers in contrasting soils. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 4(1): 1-16.

- Tjamos, S. E., Flemetakis, E., Paplomatas, E. J., Katinakis, P. (2005) Induction of resistance to *Verticillium dahliae* in *Arabidopsis thaliana* by the biocontrol agent K-165 and pathogenesis-related proteins gene expression. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18(6): 555-561.
- Upadhyay, S. K., Singh, J. S., Saxena, A. K., & Singh, D. P. (2012) Impact of PGPR inoculation on growth and antioxidant status of wheat under saline conditions. *Plant Biology*, 14: 605-611.
- Valverde, A., Burgos, A., Fiscella, T., Rivas, R., Velazquez, E., Rodríguez-Barrueco, C., Igual, J. M. (2007) Differential effects of coinoculations with *Pseudomonas jessenii* PS06 (a phosphate-solubilizing bacterium) and *Mesorhizobium ciceri* C-2/2 strains on the growth and seed yield of chickpea under greenhouse and field conditions. In *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*. Dordrecht: Springer Netherlands, p. 43-50.
- Vassilev, N., Vassileva, M., & Nikolaeva, I. (2006) Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71:137-144.
- Vidigal, S. M., Sedyama, M. A. N., Pedrosa, M. W., & dos Santos, M. R. (2010) Produtividade de cebola em cultivo orgânico utilizando composto à base de dejetos de suínos. *Horticultura Brasileira*, 28:168-173.
- Violante, H. G., & Olalde-Portugal, V. (2007) Alteration of tomato fruit quality by root inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): *Bacillus subtilis* BEB-13bs. *Scientia Horticulturae*, 113: 103-106.
- Vivanco-Calixto, R., Molina-Romero, D., Morales-García, Y. E., Quintero-Hernández, V., Munive-Hernández, A., Baez-Rogelio, A., Muñoz-Rojas, J. (2016). Reto agrobiotecnológico: inoculantes bacterianos de segunda generación. *Alianzas y Tendencias BUAP (AyTBUAP)*. Vol.1, p10.
- Wahid, O. A. A., Mehana, T. A. (2000) Impact of phosphate-solubilizing fungi on the yield and phosphorus-uptake by wheat and faba bean plants. *Microbiological research*, 155: 221-227.
- Wongwilaiwalin, S., Rattanachomsri, U., Laothanachareon, T., Eurwilaichitr, L., Igarashi, Y., Champreda, V. (2010) Analysis of a thermophilic lignocellulose degrading microbial consortium and multi-species lignocellulolytic enzyme system. *Enzyme and Microbial Technology*, 47:283-290.
- Woo, S. L., Ruocco, M., Vinale, F., Nigro, M., Marra, R., Lombardi, N., Lorito, M. (2014) Trichoderma-based products and their widespread use in agriculture. *The Open Mycology Journal*, v. 8, n. 1. 71-126p.
- Zahran, H. H. (2001) Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. *Journal of Biotechnology*, 91:143-153.

- Szilagyi-Zecchin, V. J., Mógor, Á. F., Ruaro, L., & Röder, C. (2015). Tomato seedlings growth (*Solanum lycopersicum*) promoted by bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42 in organic system. *Revista de Ciências Agrárias (Portugal)*, 38: 26-33.
- Zhang, H., Kim, MS, Sun, Y., Dowd, SE, Shi, H. e Paré, PW (2008) As bactérias do solo conferem tolerância ao sal das plantas pela regulação específica do tecido do transportador de sódio HKT1. *Interações Molecular Planta-Micróbio*, 21 (6): 737-744.
- Zhang, X., Schmidt, R. E. (2000). Hormone-containing products' impact on antioxidant status of tall fescue and creeping bentgrass subjected to drought. *Crop science*, 40: 1344-1349.
- Zhao, K., Penttinen, P., Zhang, X., Ao, X., Liu, M., Yu, X., Chen, Q. (2014) Maize rhizosphere in Sichuan, China, hosts plant growth promoting *Burkholderia cepacia* with phosphate solubilizing and antifungal abilities. *Microbiological Research*, 169(1): 76-82.