

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VANESSA VANI OBRZUT

**CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS E ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS DO
TOMATEIRO EM FUNÇÃO DO USO DE *Bacillus subtilis* EM SISTEMA DE
CULTIVO ORGÂNICO**

CURITIBA

2016

VANESSA VANI OBRZUT

**CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS E ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS DO
TOMATEIRO EM FUNÇÃO DO USO DE *Bacillus subtilis* EM SISTEMA DE
CULTIVO ORGÂNICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Átila Francisco Mógor

CURITIBA

2016

O13 Obrzut, Vanessa Vani

Características agronômicas e alterações bioquímicas do tomateiro em função do uso de *Bacillus subtilis* em sistema de cultivo orgânico. / Vanessa Vani Obrzut. - Curitiba: 2016. 59 f. il.

Orientador: Átila Francisco Mógor

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia.

1. Tomate – Cultivo. 2. Biofertilizantes. 3. Agricultura orgânica.
I. Mógor, Átila Francisco. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia.
III. Título.

CDU 635.64



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGRONOMIA - PRODUÇÃO VEGETAL



PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO, apresentada pela candidata **VANESSA VANI OBRZUT**, sob o título "**CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS E ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS DO TOMATEIRO EM FUNÇÃO DO USO DE *Bacillus subtilis* EM SISTEMA DE CULTIVO ORGÂNICO**", para obtenção do grau de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

Após haver analisado o referido trabalho e argüido a candidata são de parecer pela "**APROVAÇÃO**" da Dissertação.

Curitiba, 13 de Julho de 2016.

Professor Dr. Cícero Deschamps
Coordenador do Programa

Professor Dr. Sérgio Miguel Mazaro
Primeiro Examinador

Professor Dr. Ruy Inácio Neiva de Carvalho
Segundo Examinador

Professor Dr. Henrique da Silva Silveira Duarte
Terceiro Examinador

Professor Dr. Átila Francisco Mógor
Presidente da Banca e Orientador

AGRADECIMENTOS

A Deus por me guiar, fortalecer e proteger durante toda a minha trajetória.

Aos meus pais pela vida, e por me proverem estrutura para investir nos meus estudos.

A Universidade Federal do Paraná, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal por me proporcionar esta oportunidade. Ao CNPq por prover recursos financeiros para que essa pesquisa fosse possível.

Ao meu orientador professor Dr. Átila Francisco Mógor que me aceitou, orientou e enriqueceu a minha vida como um todo. À sua esposa Gilda que carinhosamente auxilia os orientados.

Aos professores e funcionários do departamento que contribuíram fornecendo conhecimento e auxílio.

Aos meus queridos colegas que sempre estiveram dispostos a me ajudar durante a caminhada e que, sem dúvida, tornavam os dias divertidos, especialmente Cinthia Röder, Vivian J. Szilagy-Zecchin, Luiz Gabriel Gemin, Márcia Procopiuk e Juliana de O. Amatussi.

Aos funcionários da fazenda que sempre ajudaram arduamente na rotina do campo.

À empresa HM. Clause por ceder as sementes de tomate e acreditar na minha pesquisa.

À UTFPR campus de Dois Vizinhos, em especial ao professor Sérgio Miguel Mazáro por realizar análises complementares que enriqueceram a minha pesquisa.

Ao meu amado Gustavo por deixar a minha vida mais colorida, e sempre estar disposto a me apoiar e ajudar.

Ao Carlos que caminhou por mim literalmente quando eu não podia, e que nos dias mais difíceis estava do meu lado.

As pessoas amadas do meu convívio por me ouvirem e estarem do meu lado independente do que houvesse.

Foram muitas pessoas que ajudaram para que esse trabalho se concretizasse, pode ser que não estejam citadas aqui e que sem dúvidas estão em minha memória e meu coração, levo o conhecimento, os valores morais e os bons colegas que adquiri pelo caminho que percorri ao longo desses anos.

RESUMO

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) ocupa posição importante no setor de olericultura, tem demanda frequente e mundial e retorno econômico considerável. Também existe a busca dos consumidores por produtos mais saudáveis, ou seja, cultivados em sistemas sustentáveis sem ou com o mínimo resíduo químico possível. Como opção para atender a esses requisitos associam-se as bactérias como métodos alternativos aos agroquímicos e nesse estudo, especificamente, a espécie *Bacillus subtilis* que já mostrou resultados promissores em sistema de produção orgânica. Foram conduzidos dois experimentos na Área de Olericultura Orgânica da Universidade Federal do Paraná (UFPR), no município de Pinhais – PR em duas safras 2013/2014 e 2014/2015. Utilizou-se duas cultivares de tomate tipo italiano, Cardyna e Trindade, em ambos os experimentos. O primeiro experimento teve como objetivo avaliar a influência de *B.subtilis* em crescimento inicial e o delineamento experimental foi totalmente casualizado em arranjo fatorial com 3 formas de aplicação da bactéria: semente; rega; testemunha que não recebeu aplicação; nas duas cultivares de tomate tipo italiano. Foram avaliadas as variáveis massa fresca e seca de folhas, caules e raízes também parte área. O segundo experimento teve como objetivo avaliar a influência da bactéria na produção e as alterações bioquímicas no tomateiro, o delineamento experimental foi totalmente casualizado em arranjo fatorial em 4 formas de aplicação da bactéria: rega; pulverização foliar; rega + pulverização foliar; testemunha sem aplicação; nas duas cultivares de tomate tipo italiano. As variáveis de produção analisadas das plantas adultas foram: diâmetros equatorial e longitudinal dos frutos, massa média de frutos e produção média por planta. As análises bioquímicas foram: clorofila, açúcares, aminoácidos, compostos fenólicos, flavonoides, proteínas, fenilalanina amônia-liase, quitinase e β -1,3-glucanases. Os resultados demonstram que *B.subtilis* estimulou o crescimento inicial de plantas de tomateiro incrementando valores de massa fresca, seca e parte aérea quando aplicado como rega, apresentando interações com o genótipo de cultivares utilizadas. A bactéria *B.subtilis*, não influenciou a produção das cultivares 'Cardyna' e 'Trindade' em safras sucessivas. Entretanto estimulou a produção de pigmentos relacionados com a fotossíntese, clorofila *a*, *b*, total e carotenoides, apresentando interações com os genótipos quanto ao acúmulo de açúcares redutores e não redutores e proporcionou o incremento das enzimas fenilalanina amônia-liase, quitinase e β -1,3-glucanases, relacionadas à defesa das plantas sem que houvesse custos na produção. As formas de aplicação apresentaram interação com o genótipo e com a variável analisada.

Palavras chave: *Solanum lycopersicum* L, bactérias promotoras do crescimento de plantas, biofertilizantes, sustentabilidade.

ABSTRACT

Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) occupies an important position in the horticulture industry, has frequent and global demand and considerable economic returns. There is also the search consumers for healthier products, cultivated in organic systems without or with minimum chemical residue. As an option to meet these requirements there are bacteria as alternative methods to pesticides and this study specifically, the *Bacillus subtilis* species that has shown promising results in organic production system. Two experiments were conducted in the Organic Vegetable Crops Area of the Federal University of Paraná (UFPR), in the city of Pinhais - PR in two seasons 2013/2014 and 2014/2015. It used two Italian type tomato cultivars, Cardyna and Trinidad, in both experiments. The first experiment was to evaluate the influence of *B. subtilis* in initial growth and the experimental design was completely randomized in a factorial arrangement with 3 application forms of bacteria: seed; irrigation; control who did not receive the application; the two Italian type tomato cultivars. The variables fresh and dry weight of leaves, stems and roots also aerial parts were evaluated. The second experiment was to evaluate the influence of bacteria in the production and biochemical changes in the tomato, the experimental design was completely randomized in a factorial arrangement 4 application forms of bacteria: irrigation; foliar spray; Irrigation + foliar spray; control without application; the two Italian type tomato cultivars. Production variables of adult plants were equatorial and longitudinal diameters of fruit, average fruit weight and average yield per plant. Biochemical analyzes were chlorophyll, sugars, amino acids, phenolic compounds, flavonoids, proteins, phenylalanine ammonia-lyase, chitinase and β -1,3-glucanases. The results showed that *B. subtilis* stimulated the initial growth of tomato plants increasing values of fresh, dried weight when applied as irrigation, showing interactions with the genotype used cultivars. The *B. subtilis* bacteria did not influence the production of the cultivars 'Cardyna' and 'Trinidad' in successive seasons. However it stimulated the production of related pigments with photosynthesis, chlorophyll b, and total carotenoid, showing interactions with the genotypes for the accumulation of reducing sugars and non-reducing and provided increased enzyme phenylalanine ammonia-lyase, chitinase and β -1,3-glucanases, related to the protection of plants without there costs in production. The forms of application presented interaction with the genotype and the variable analyzed.

Keywords: *Solanum lycopersicum* L, plant growth promoting bacteria biofertilizers, sustainability.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1 TOMATEIRO	12
2.2 CULTIVO ORGÂNICO	13
2.3 <i>Bacillus subtilis</i>	15
REFERÊNCIAS	19
3.CRESCIMENTO INICIAL DE DUAS CULTIVARES DE TOMATEIRO EM FUNÇÃO DA APLICAÇÃO DE <i>Bacillus subtilis</i> EM MUDAS	24
3.1 RESUMO.....	24
3.2 INTRODUÇÃO	25
3.3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	27
3.5 CONCLUSÕES	31
LITERATURA CITADA.....	31
4.PRODUÇÃO EM ANOS SUCESSIVOS E ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS EM CULTIVARES DE TOMATEIRO EM SISTEMA ORGÂNICO COM APLICAÇÕES DE <i>Bacillus subtilis</i>	33
4.1 INTRODUÇÃO	34
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.3 RESULTADOS	38
4.4 DISCUSSÃO	43
4.5 CONCLUSÕES	48
REFERÊNCIAS	49
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
ANEXOS	52

1 INTRODUÇÃO

Segundo dados do CEASA – PR (2013) no grupo de hortaliças fruto, o tomate ocupa 51,6 % do volume comercializado e está entre as hortaliças mais comercializadas. A produção de hortaliças no Brasil chegou a 25 milhões de toneladas/ano, em uma área de 656.730 mil hectares e tem movimentado aproximadamente 100 bilhões de reais em valor de produção que agregou custos e receitas no ano de 2013 (ABCSEM, 2014).

Quanto ao volume de exportação, o tomate ocupa a sexta posição apresentando 4.911.812 kg enviados para fora do Brasil no ano de 2014 e essa soma abrange um valor em dólares de 6 milhões (SANTOS, 2015). Em 2015 foram produzidas 7.439.917 toneladas do fruto, apresentando um aumento de 20,4% em relação ao ano anterior (IBGE, 2015).

O tomateiro é uma cultura considerada cosmopolita por ser cultivada em muitos países, essa solanácea chegou ao Brasil no final do século XIX trazida pelos imigrantes europeus e ocupa a posição de segundo lugar em termos de importância econômica (FILGUEIRA, 2008).

A maior conscientização dos consumidores tem levado ao crescimento do mercado de produtos orgânicos de aproximadamente 30% ao ano, e esse público demanda alimentos saudáveis e seguros, além disso, existe a preocupação pelo meio ambiente (MELO *et al.*, 2009).

O foco da produção orgânica é maximizar o uso dos recursos naturais e também socioeconômicos tendo como objetivo a sustentabilidade tanto econômica quanto ecológica, trazendo consigo benefícios sociais e também a independência de fontes de energia não renováveis e a proteção da natureza (BRASIL, 2003).

Através da utilização de BPCP em cultivos orgânicos obtêm-se produtos finais mais saudáveis, pois além de favorecerem o desenvolvimento das plantas através de promoção de crescimento e ativação de defesa das plantas, as bactérias não produzem resíduos químicos ou contaminantes que possam de alguma forma prejudicar a natureza.

Bacillus e *Pseudomonas* são gêneros de bactérias que fazem parte de um grupo nomeado de BPCP (Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas) que exercem um efeito direto no crescimento de plantas através da produção de

fitormônios e também agem na indução de resistência sistêmica contra grande espectro de patógenos de raízes e foliares (PODILE e KISHORE, 2006).

Entre os vários microrganismos benéficos estão as cepas do gênero *Bacillus* que têm grande importância. Essas bactérias são do tipo gram-positivas e comumente encontradas no solo com capacidade de formar endósporos de proteção que permitem tolerar condições ambientais extremas (ERRINGTON, 1993).

O sucesso de *Bacillus subtilis* na promoção do crescimento de plantas está relacionado com as características biológicas deste microrganismo que apresenta também ação na redução de doenças e incremento de produtividade já comprovados (LANNA *et al.*, 2010). As comunidades bacterianas endofíticas nas plantas de tomateiro têm um grande impacto sobre a qualidade do fruto e rendimento de diferentes variedades (XU *et al.*, 2014).

Por ser um alimento amplamente consumido mundialmente e ter essa grande importância econômica, as pesquisas estão voltadas à produção aliada com alternativas sustentáveis na qual o resultado final é um produto com melhor características para ser oferecido ao consumidor e também um sistema de produção menos agressivo ao meio ambiente.

Diante desse cenário que busca boa produtividade de tomate com qualidade e sustentabilidade, objetivou-se avaliar os efeitos da bactéria *Bacillus subtilis* no crescimento inicial e em plantas adultas de tomateiro, avaliando seus aspectos fenológicos, biométricos, bioquímicos e de produção.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 TOMATEIRO

O tomate é uma hortaliça amplamente cultivada nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Seu cultivo tornou-se cada vez mais popular desde meados do século XIX, por causa da sua tolerância climática e bons valores nutritivos. Atualmente o cultivo de tomate é o foco da horticultura e tem um lugar distinto no grupo das hortaliças (WALIA *et al.*, 2014).

Originário do México, o tomate adaptou-se ao clima temperado do Centro - Sul do Brasil produzindo boas safras (KHATOUNIAN, 2001).

A taxonomia botânica do tomateiro mudou por diversas vezes ao longo do tempo. Inicialmente, foi classificado por TOURNEFORT como sendo do gênero *Lycopersicon*, Carl Van Linnaeus o reclassificou como *Solanum*, MILLER em 1754 o definiu como sendo do *Lycopersicon* e novamente, anos mais tarde, em 1768 descreveu a espécie cultivada definindo-a como *L.esculentum* (MILLER 1754 citado por PERALTA *et al.*, 2006).

Estudos realizados apresentaram grande similaridade genética entre *Lycopersicon esculentum* e espécies pertencentes ao gênero *Solanum* e, através de resultados baseados em mapeamento genético, o tomate foi reclassificado como *Solanum lycopersicum* que é a nomenclatura aceita e utilizada atualmente (SPOONER *et al.*, 2005).

Por ter boa aceitação no mercado e também preços compensadores, o tomate é uma das hortaliças de fruto de maior interesse pelos produtores (RODRIGUES *et al.*, 2010). O mercado consumidor de tomate situa-se nos grandes centros em que o varejo tem a função de ofertar novidades no setor.

A pressão exercida pela demanda dos consumidores faz com que os varejistas passem a exigir qualidade de fruto, tipos diferente do produto, segurança alimentar e frequência da oferta para atender a essa demanda (ABCSEM, 2010).

A comercialização do tomate compreende dois segmentos, o de mesa destinado para consumo *in natura* e também o mercado de indústria com frutos direcionados para o processamento. O tipo do tomate é classificado pelo formato e

tamanho de frutos, podendo ser do tipo santa cruz, salada, caqui, italiano e cereja (NASCIMENTO, 2011).

É considerado uma hortaliça do tipo fruto com hábito de crescimento determinado para tomates para processamento industrial ou em geral indeterminado para tomates de consumo *in natura*. É classificado como baga podendo ter dois, três ou vários lóculos alcançando massa entre 5 e 500 g por fruto (ALVARENGA, 2004).

O grupo de tomate tipo Saladete, também chamado tomate italiano é o mais novo no mercado e apresenta dupla aptidão sendo recomendado para consumo *in natura* ou processamento (MACHADO *et al.*, 2007). As cultivares pertencentes a este grupo em geral são híbridas, apresentam sabor adocicado, textura e aroma agradáveis (ANDRADE, 2012). As características dos frutos são: alongados com 7 a 10 cm de comprimento, diâmetro transversal de 3 a 5 cm; biloculares; polpa espessa de coloração vermelha intensa; firmes e saborosos (FILGUEIRA, 2008). A massa média dos frutos dessa categoria varia entre 80 a 200 g que é o padrão exigido pelo mercado (ALVARENGA, 2000).

As cultivares do tipo híbrido simples são as favoritas pelo potencial produtivo, precocidade, estabilidade genética, resistência a pragas e doenças, maior proporção de frutos comerciais e boa conservação e qualidade pós-colheita (NASCIMENTO, 2011). Quando comparados com os frutos do tipo longa vida apresentam qualidades sensoriais superiores, tornando-se mais atrativos, possuem boa uniformidade e exibem coloração intensa (SHIRAHIGE *et al.*, 2010).

O tomate tipo italiano/saladete destaca-se pelo sabor suave devido à correlação entre açúcares e ácidos. Tal característica favorece a utilização deste fruto pela indústria alimentícia e quando está em coloração vermelha intensa é utilizado pela indústria por ter boa quantidade de polpa e ricos teores nutricionais (MONTEIRO *et al.*, 2008)

2.2 CULTIVO ORGÂNICO

O foco da produção orgânica é maximizar o uso dos recursos naturais e também socioeconômicos tendo como objetivo a sustentabilidade tanto econômica

quanto ecológica, trazendo consigo benefícios sociais e também a independência de fontes de energia não renováveis e a proteção da natureza (BRASIL, 2003).

A prática da agricultura orgânica ocorre em 170 países totalizando área de 43,1 milhões de hectares em 2012. As regiões que ocupam maior proporção são Oceania (40%), Europa (27%), América Latina (15%), Ásia (8%), América do Norte (3%) e África (3%). O cenário latino é dominado pela Argentina com 3,6 milhões ha, Uruguai com 0,9 milhões ha e em terceiro lugar Brasil com 0,7 milhões ha (FIBL e IFOAN, 2015).

Em 1999 a área orgânica mundial era de 11 milhões de hectares e quando comparada com os dados atuais, essa área praticamente quadruplicou. O grupo das olerícolas compreende 4% do total da área orgânica mundial e, dentro desse grupo, está o tomate (FIBL e IFOAM, 2015).

O Paraná é o segundo estado brasileiro em número de atividades orgânicas certificadas do Brasil, ficando atrás apenas do Rio Grande do Sul (Governo do Estado do Paraná, 2016). Dentre os grupos de produtos orgânicos, as hortaliças apresentam o maior número de produtores envolvidos. Esse cultivo é feito geralmente nos municípios que compõem a região metropolitana de Curitiba, o chamado “cinturão verde” (SALVADOR, 2011).

Em grande parte, os biofertilizantes são baseados nos microrganismos do grupo das BPCP que exercem efeitos benéficos no desenvolvimento da planta muitas vezes relacionados com o aumento da disponibilidade de nutrientes para a mesma (VESSEY, 2003). Existem também outros mecanismos dessas bactérias que favorecem o desenvolvimento da planta que envolve a supressão de doenças, e também a produção de fitormônios e peptídeos que agem como bioestimulantes (JIMENEZ-DELGADILLO, 2004).

Biofertilizante é o produto, que contém componentes ativos ou agentes biológicos, capaz de atuar, direta ou indiretamente, sobre o todo ou parte das plantas cultivadas, melhorando o desempenho do sistema de produção e que seja isento de substâncias proibidas pela regulamentação de orgânicos (BRASIL, 2011).

Os consumidores vêm dando maior importância para a saúde, assim buscando alimentos mais saudáveis. Nessa mesma via os produtores notam a necessidade de fornecer produtos que atendam às exigências do mercado. A conscientização das mudanças climáticas e seu impacto no cultivo levam os

produtores a buscarem novas saídas para técnicas de manejo que tragam benefícios para eles e para os consumidores (SALVADOR, 2011).

No conceito orgânico está implícito um modelo ideal onde a propriedade é produtiva, tenta minimizar a dependência de recursos externos, preserva os recursos naturais e é economicamente viável (KHATOUNIAN, 2001). Nesse panorama os produtores rurais devem se adequar nesses novos sistemas de produção com a gradativa eliminação de agroquímicos e quaisquer outros insumos químicos (DAROLT, 2002).

Uma nova geração de consumidores têm surgido, conhecidos como “consumidores ecológicos” estão dispostos a pagar um preço extra por adquirir alimentos obtidos através de sistema orgânico de cultivo (LAZARO *et al.*, 2010). A pressão exercida por esse novo perfil de consumidores fez com que o crescimento do cultivo orgânico nos últimos anos fosse de ritmo acelerado (KISS, 2009).

O aumento no consumo de produtos orgânicos não está somente relacionado com a melhor qualidade nutricional, mas também com o sistema de produção, sustentabilidade e conceitos sociais (SOUZA e ALCÂNTARA, 2003).

A filosofia que dá origem a esse sistema de produção privilegia o objetivo de produzir alimentos inócuos e de alta qualidade procurando a saúde ecológica em longo prazo (HERNANDEZ *et al.*, 2010).

Esse novo perfil de consumidores que estão dispostos a comprar hortaliças livres de resíduos de agroquímicos abre um novo espaço de mercado para que os produtores possam explorá-lo (MADAIL *et al.*, 2007).

Em busca de um meio de produção agrícola mais sustentável, sem agredir a natureza e suprimindo a demanda dos consumidores por produtos mais saudáveis, a agricultura orgânica é uma opção prioritária para a produção de tomate (NASSUR, 2009).

2.3 *Bacillus subtilis*

O cientista alemão Christian Gottfried Ehrenberg foi o primeiro a descrever a bactéria em 1835 que inicialmente foi chamada de *Vibrio subtilis* (EHRENBERG 1835 citado por RASMUSSEN *et al.*, 2009, p 1043). Anos mais tarde, em 1872 outro cientista alemão Ferdinand Julius Cohn a rebatizou como *Bacillus subtilis* e também

apresentou a capacidade dessa espécie de sobreviver em ambientes hostis (COHN, 1872 citado por RASMUSSEN *et al.*, 2009, p 1043). Em 1930 o bacteriologista americano Harold Joel Conn publicou uma descrição da estirpe *B. subtilis* Marbug (CONN, 1930 citado por RASMUSSEN *et al.*, 2009, p 1043). O primeiro sequenciamento genético foi realizado por Kunst *et al.* (1997) e novamente sequenciado por Barbe *et al.* (2009).

A exposição a células vivas de *B. subtilis* pode proporcionar efeito de crescimento e/ou proteção, sendo este último gerado por mecanismos de competição entre o patógeno e a bactéria por espaço e nutrientes na planta (HAMMAMI *et al.*, 2009). *Bacillus subtilis* é o organismo mais bem caracterizado de bactérias gram-positivas, possui alta capacidade de secretar grandes quantidades de enzimas que tem importância industrial que estão envolvidos na síntese de metabólitos secundários incluindo antibióticos (KUNST *et al.*, 1997).

Os metabólitos produzidos por estirpes de *B. subtilis* apresentam efeito antibiótico relacionado com compostos do grupo das iturinas e promoção de crescimento relacionado com a produção de ácido indolacético demonstrando potencial resultado para utilização no controle de patógenos e promoção de crescimento de plantas (ARAUJO *et al.*, 2008).

Kai *et al.* (2007) afirmaram que a bactéria *B. subtilis* produz várias substâncias voláteis que apresentam função antifúngica, porém boa parte dessas substâncias ainda são desconhecidas. A Iturina A é considerada antibiótico e possui atividades antifúngicas e surfactina possui efeito sinérgico antifúngico quando em companhia de iturina A. Ambos são lipopeptídeos extraídos de cepa de *B. subtilis* (MAGET-DANA *et al.*, 1992).

A relação de associação de *B. subtilis* é do tipo endofítica, muitas estirpes dessa bactéria são conhecidos por fixar nitrogênio, formar endósporos, resistir à dessecação e a sobreviver em condições adversas. Produzem um amplo número de substâncias induzindo a resistência sistêmica da planta aumentando o nível de peroxidase e polifenoloxidase (RAMYABHARATHI e RAGUCHANDER, 2014). Plantas inoculadas com *B. subtilis* no solo apresentaram concentrações maiores de peroxidase em seus tecidos do que plantas pulverizadas com a bactéria na parte aérea (ARAUJO e MENEZES, 2009).

Essa mesma bactéria apresenta ação antimicrobiana e surfactante nos lipopeptídeos que produz, esse efeito ocasiona redução da bactéria *Xanthomonas*

campestris pv. *campestris* que causam podridão negra, podendo portanto ser utilizado como agente de controle biológico (MONTEIRO *et al.*, 2005).

A cepa *B. subtilis* C-RB14 demonstrou claramente ter efeito supressor sobre a incidência de murchamento causado por *Rhizoctonia solani* na cultura do tomate, embora essa bactéria não seja considerada uma representante das espécies da rizosfera assim como *Pseudomonas* spp., devido à sua densidade de população e permanência no solo é um importante fator de supressão da doença (ASAKA e SHODA, 1996).

A bactéria *B. subtilis* abrange atua na resistência sistêmica das plantas na planta hospedeira, competição por espaço e nutrição e sintetização de antibióticos. Quando não há presença de fitopatógenos na planta essa bactéria promove o crescimento da planta (OWNLEY e WINDHAM, 2010). De acordo com RYU *et al.* (2004) as BPCP em associação com raízes das plantas podem desencadear o efeito de resistência sistêmica induzida (ISR), em que o patógeno desencadeia a indução de ácido salicílico e em contra partida a bactéria produz ácido jasmônico e etileno.

As BPCP podem influenciar no crescimento da planta através da síntese de fitormônios e vitaminas, inibindo a síntese de etileno na planta, aumentando a resistência a estresses e melhorando a absorção de nutrientes (DOBBELAERE *et al.*, 2003).

No tomateiro a aplicação de *B. subtilis* aumentou a biomassa da parte aérea e também atuou interferindo no crescimento de população do nematóide causador de galha na raiz, o que demonstra ser uma opção para manejo integrado de doenças na cultura (ARAÚJO e MARCHESI, 2009). O controle de nematóide também é observado em cana-de-açúcar após utilização de suspensão aquosa de *Bacillus subtilis* e além do efeito sobre as galhas, a bactéria promoveu crescimento da planta (CARDOZO e ARAÚJO, 2011).

A alteração na atividade de determinadas enzimas como a fenilalanina amônia-liase, as β -1,3-glucanases e as quitinases podem permitir o acompanhamento do estado de resistência da planta quando exposta a patógenos (BAYSAL *et al.*, 2003). A determinação das proteínas permite averiguar essas alterações e associa-las ou não como efeito de *B. subtilis*.

O sucesso de *B. subtilis* na promoção do crescimento de plantas está relacionado com as características biológicas deste microrganismo que apresenta também ação na redução de doenças e incremento de produtividade já

comprovados em vários trabalhos (LANNA *et al.*, 2010). Aumento de fixação de nitrogênio, melhor aproveitamento de nutrientes através da maior sensibilidade das raízes e também síntese de fitormônios favorecem a promoção de crescimento mediada pela bactéria *B. subtilis* (MANJULA e PODILE, 2005).

A adição de *B. subtilis* na solução nutritivas de alface hidropônica aumentou a massa das plantas em 6%, número de folhas em 4% e também o teor de clorofila das plantas do experimento (CORREA *et al.*, 2010). Aplicação de *B. subtilis* no solo promoveu incremento de biomassa fresca em plantas de pepino através do aumento do seu crescimento, e também reduziu significativamente a incidência de CMV (*Cucumber mosaic virus*) (CRUZ *et al.*, 2008).

A bactéria *B. subtilis* também mostrou resultados positivos quanto à sua utilização como inoculante em leguminosas, apresentando aumento na quantidade de nódulos o que representa maior fixação de nitrogênio e potencial para aumentar o crescimento das plantas (ARAÚJO *et al.*, 2009). Sementes de milho, algodão e soja inoculadas com *B. subtilis* apresentaram aumento na emergência e também incremento na massa seca, além de que os teores de fósforo e nitrogênio foram maiores no tecido foliar do milho tratado com a bactéria, isso demonstra o efeito positivo sobre crescimento de plantas (ARAÚJO, 2008).

Atualmente produtos a base de *B. subtilis* se mostram eficientes na redução da intensidade de doenças e também promovem o crescimento de plantas, além de serem menos agressivos ao meio ambiente, pois não geram resíduos químicos ou contaminantes, o que é um fator positivo para a diminuição de utilização de produtos químicos que causam danos ambientais (LANNA *et al.*, 2010).

Neste estudo, o objetivo foi determinar os efeitos da aplicação de *B. subtilis* em tomateiro conduzido no sistema orgânico, investigando a influencia no crescimento inicial de plantas e também em plantas adultas averiguando os efeitos na produtividade e alterações bioquímicas.

REFERÊNCIAS

- ABCSEM, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DO COMÉRCIO DE SEMENTES E MUDAS. **2º Levantamento de dados socioeconômicos da cadeia produtiva no Brasil**. Holambra, 2010, 58 p.
- ABCSEM, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DO COMÉRCIO DE SEMENTES E MUDAS. **Tomate lidera crescimento e lucratividade no setor de hortaliças**. Disponível em: <<http://www.abcsem.com.br/releases/284/tomate-lidera-crescimento-e-lucratividade-no-setor-de-hortalicas->>. Acesso em 18 de junho de 2016.
- ALVARENGA, M.A.R. **Cultura do tomateiro**. Lavras: UFLA, 2000. 91p.
- ALVARENGA, M.A.R. **Tomate: produção em campo, casa de vegetação e hidroponia**. Lavras: UFLA, 2004. 400p.
- ANDRADE, M.C. **Capacidade combinatória de linhagens de tomateiro em híbridos do tipo italiano**. 37 f. Tese (Mestrado em Produção Vegetal). Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2012.
- ARAUJO, F.F.; Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de ostras e desenvolvimento de milho, soja e algodão. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, n.2, p.456-462, 2008.
- ARAUJO, A.S.F.; MENEZES, D. Indução de resistência a doenças foliares em tomateiro por indutores biótico (*Bacillus subtilis*) e Abiótico (Acibenzolar-S-Metil). *Summa Phytopathologica*, v.35, n.3, 2009.
- ASAKA, O.; SHODA, M.; Biocontrol of *Rhizoctonia solani* Damping-Off of Tomato with *Bacillus subtilis* RB14. **Applied and environmental microbiology**, v.62, n.11, p. 4081–4085, 1996.
- BARBE, V.; CRUVEILLER, S.; KUNST, F.; LENOBLE, P.; MEURICE, G.; SEKOWSKA, A.; VALLENET, D.; WANG, T.; MOSZER, I.; MÉDIGUE, C.; DANCHIN, A. From a consortium sequence to a unified sequence: the *Bacillus subtilis* 168 reference genome a decade later. **Microbiology**, v. 155, p. 1758–1775, 2009.
- BAYSAL, O.; SOYLU, E.M.; SOYLU, S. Induction of defence-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. **Plant Pathology**, v. 52, p.747-753,2003.
- BRASIL. Lei nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003. Diário Oficial da União. Brasília, D.F.
- BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 46, DE 6 DE OUTUBRO DE 2011. Diário Oficial da União, Brasília, D.F.

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

CEASA PR. **Boletim Técnico Ceasa/ PR**. Curitiba, p. 1-84, 2013.

CORREA, E.B.; BETTIOL, W.; SUTTON, J.C. Controle biológico da podridão radicular (*Pythium aphanidermatum*) e promoção de crescimento por *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 e *Bacillus subtilis* GB03 em alface hidropônica. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.4, p.275-281, 2010.

CRUZ, M.C.; MARTINEZ, D.L.O.; BOLAÑOS, B.T.; Efecto del ácido acetil salicílico y *Bacillus subtilis* en la infección causa por Cucumber mosaic virus en calabacita. **Revista Chapingo Serie Horticultura**, v. 14, n. 1, p. 55-59, 2008.

DAROLT, M. R. **Agricultura orgânica: inventando o futuro**. Londrina: IAPAR, 2002. 250 p.

DOBBELAERE, S.J.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Revista Plant Science**, v. 22, p. 107-149, 2003.

ERRINGTON, J. *Bacillus subtilis* sporulation, regulation of gene expression and control of morphogenesis. **Microbiological Reviews**, v.57, n.1, p. 1-33, 1993.

FIBL, RESEARCH INSTITUTE OF ORGANIC AGRICULTURE.; IFOAN, FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DE MOVIMENTOS DA AGRICULTURA ORGANICA. **The World of Organic Agriculture: Statistics e Emerging Trends**. 2015, 306 p.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. UFV, 2008.

GOVERNO DO ESTADO DO PARANÁ. Alimentos saudáveis. **Paraná tem 1.485 propriedades rurais certificadas com produção de orgânicos**. Disponível em: <<http://www.aen.pr.gov.br/modules/noticias/article.php?storyid=85004>>. Acesso em: 18 de junho de 2016.

HAMMAMI, I.; RHOUMA, A.; JAOUADI, B.; REBAI, A.; NESME, X. Optimization and biochemical characterization of a bacteriocin from a newly isolated *Bacillus subtilis* strain 14B for biocontrol of *Agrobacterium* spp. strains. **Letters in Applied Microbiology**, v.48, p.253–260, 2009.

HERNÁNDEZ, J.L.G; CASTILLO, I.O.; SOSA, H.S.; VÁZQUEZ, C.V.; TARANGO, R.Z.; MARTÍNEZ, J.D.L.; PUENTE, E.O.R. Filosofía, desarrollo y adopción de la agricultura orgánica: el caso de México. **AgroFaz**, v.10, n.1, p. 1-9, 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistemático_da_Producao_A>

[gricola_%5Bmensal%5D/Fasciculo/lspa_201501.pdf](#)> Acesso em: 27 de janeiro de 2016

JIMENEZ-DELGADILLO, M.R.; **Peptidos Secretados por *Bacillus subtilis* que Codifican la Arquitectura de la Raiz de *Arabidopsis thaliana***. 2004. Tese (PhD). CINVESTAV, Unidad Irapuato, México, 2004.

KAI, M.; EFFMERT, U.; BERG, G.; PIECHULLA, B. Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. **Archives of Microbiology**, v.187, p.351–360, 2007.

KHATOUNIAN, C.A. **A reconstrução ecológica da agricultura**. Botucatu, SP: Agroecologia, 2001.

KISS, J. O desafio de ser grande. **Globo Rural**, n. 284, p. 34-42, 2009.

KUNST, F. *et al.* The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. **Nature**, v. 390, p.249-256, 1997.

LANNA, R.F.; FERRO, R.; PINHO, R.S.C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica**, v.4, n.2, p.12, 2010.

LAZARO, E. D.L.C.; OSORIO, R.O.; MORENO, E.M.; RÍO DEL, A.J.L.; VASQUEZ, A.G.; HERNÁNDEZ, R.S. Uso de compostas y vermicompostas para la producción de tomate orgánico en invernadero. **Interciencia**, v. 35, n.5, p. 363-368, 2010.

MACHADO, A.Q.; ALVARENGA, M.A.; FLORENTINO, C.E. Produção de tomate italiano (saladetes) sob diferentes densidades de plantio e sistemas de poda visando ao consumo *in natura*. **Horticultura brasileira**, v.25, n.2, 2007.

MADAIL, J. C. M.; ANTUNES, L. E.; BELARMINO, L. C.; SILVA, B. A.; GARDIN, J. A. **Avaliação Econômica dos Sistemas de Produção de Morango: Convencional, Integrado e Orgânico**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado (Comunicado Técnico 181), 2007.

MAGET-DANA, R.; THIMON, L.; PEYPOUX, F.; PTAK, M. Surfactin/Iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. **Biochimie**, v.74, p.1047–1051, 1992.

MANJULA, K.; PODILE, A.R. Increase in seedling emergence and dry weight of pigeon pea in the field with chitin-supplemented formulations of *Bacillus subtilis* AF 1. **World Journal of Microbiology e Biotechnology**, v.21, p.1057–1062, 2005.

MELO, P.C.T. *et al.* Desempenho de cultivares de tomateiro em sistema orgânico sob cultivo protegido. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n.4, p. 553-559, 2009.

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

MONTEIRO, L., MARIANO, R.L.R.; MAIOR, A.M.S. Antagonismo f *Bacillus* spp. Against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.48, n.1, p-23-29, 2005.

NASCIMENTO, I.R. Cresce a demanda por mini tomate italiano. **Revista Campo e Negócio**, v.70, p.42-43, 2011.

NASSUR, R.C.M.R. **Qualidade pós-colheita de tomates tipo italiano produzidos em sistema orgânico**. 127 p. Tese (Mestrado em Ciências dos Alimentos), Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2009.

OWNLEY, B. H.; WYNDHAM, M. T. Controle Biológico de Fitopatógenos. In: TRIGIANO, ROBERT N.; WINDHAM, MARK T; WINDHAM, ALAN S. **Fitopatologia conceitos e exercícios de laboratório**.2010, p. 447-460.

PERALTA, I.E.; KNAPP, S.; SPOONER, D.M. Nomenclature for wild and cultivated tomatoes. **Tomato Genetics Cooperative Report**, v.56, v.1, p. 6-12, 2006.

PODILE, A. R.; KISHORE, G. K. Plant Growth Promoting Rhizobacteria. In: GNANAMANICKAM, S.S. (Ed.). **Plant-Associated Bacteria, Springer**, 2006. p.195–230.

RAMYABHARATHI, S.A.; RAGUCHANDER, T. Induction of Defense Enzymes in Tomato in Responde to Treatment wiht *Bacillus subtilis* EPCO 16 Liquid Formulation. **The Journal of Mycology and Plant Pathology**, v.44, n.1, p.122-124, 2014.

RASMUSSEN, S.; NIELSEN, B.J.; JARMER,H. The Transcriptionally active regions in the genome of *Bacillus subtilis*. **Molecular Microbiology**, v.73, n.6, p.143-1057,2009.

RODRIGUES, E.T.; LEAL, P.A.M.; COSTA, E.; PAULA, T.S.; GOMES, V.A. Produção de mudas de tomateiro em diferentes substratos e recipientes em ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**, v.28, n.4, p. 483-488, 2010.

RYU, C.M.; FARAG, M.A.; HU, C.-H.; REDDY, M.S.; KLOEPPER, J.W.; PARÉ, P.W. Bacterial Volatiles Induce Systemic Resistance in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v.134, p.1017–1026, 2004.

SALVADOR, C. A. **Análise da conjuntura agropecuária safra 2011/12 – Agricultura Orgânica**. Curitiba: SEAB/DERAL, 2011.

SANTOS, C.E. **Anuário brasileiro de hortaliças 2015**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2015. 68 p.

SHIRAHIGE, F.H.; MELO, A.M.T.; PURQUERIO, L.F.V.; CARVALHO, C.L.R.; MELO, P.C.T. Produtividade e qualidade de tomates Santa Cruz e Italiano em função do raleio de frutos. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n.3, p.292-298, 2010.

SOUZA, A.P.O.; ALCÂNTARA, R.L.C. Alimentos orgânicos: estratégias para o desenvolvimento de mercado. In: NEVES, M.F.; CASTRO, L.T. (Org.) **Marketing e estratégia em agronegócios e alimentos**. São Paulo: Atlas, 2003, 365 p.

SPOONER, D.M.; PERALTA, I.E.; KNAPP, S. Comparison of AFLPs with other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes [*Solanum* L. section *Lycopersicon* (Mill.) Wettst.]. **Taxon**, v. 54, n.1, p. 43-61, 2005.

VESSEY, J.K.; Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant Soil**, v.255, n.2, p.571–586, 2003.

WALIA, A.; ,METHA, P.;CHAUHAN, A.; SHIRKOT, C.K. Effect of *Bacillus subtilis* Strain CKT1 as Inoculum on Growth of Tomato Seedlings Under Net House Conditions. **Biological Sciences**, v.84, n.1, p.145-155, 2014.

XU, M.; SHENG, J.; CHEN, L.; MEN, Y.; GAN, L.; GUO, S.; SHEN,L. Bacterial community compositions of tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill.) seeds and plant growth promoting activity of ACC deaminase producing *Bacillus subtilis* (HYT-12-1) on tomato seedling. **World Journal of Microbiology e Biotechnology**, v.30, p. 835-845, 2014.

CRESCIMENTO INICIAL DE DUAS CULTIVARES DE TOMATEIRO EM FUNÇÃO DA APLICAÇÃO DE *Bacillus subtilis* EM SEMENTES E MUDAS

3.1 Resumo

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) se destaca entre os cultivos olerícolas, tem uma demanda frequente e mundial com um retorno econômico considerável, especialmente se obtidos em sistemas de produção sustentáveis. No sistema de produção orgânica a utilização de bactérias promotoras do crescimento de plantas é uma alternativa. Nesse estudo o objetivo foi avaliar os efeitos da aplicação da bactéria *Bacillus subtilis*, no crescimento inicial de plantas de tomateiro de duas cultivares do tipo italiano, Cardyna e Trindade. O delineamento foi inteiramente casualizado com 3 métodos de aplicação sendo: inoculação da semente; rega da muda no transplante; testemunha sem aplicação; nas duas cultivares de tomate italiano. Aos 60 dias após o semeio foram avaliadas as massas fresca e seca de folhas, caules e raízes e também parte aérea das plantas. A rega em mudas de tomate com *Bacillus subtilis* promoveu incrementos nos valores médios de massa fresca das plantas. A cultivar 'Trindade' apresentou maior acúmulo de massa fresca. *Bacillus subtilis* não apresentou interação com os genótipos quanto à massa seca de folhas e a cultivar 'Trindade' acumulou maior massa seca de folhas. Trindade acumulou maior massa seca de caules e raízes através da rega com bactéria, já a cultivar Cardyna não apresentou incremento.

Palavras-chave: *Solanum lycopersicum* L, biofertilizantes, agricultura orgânica, olericultura, bactérias promotoras do crescimento de plantas.

Abstract

Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) stands out among the vegetable crops, has a frequent and world demand with a considerable economic return, especially if obtained from sustainable production systems. In the organic production system can be to use bacterial promoters plant growth is an alternative. In this study the objective was evaluate the effects of the application of *Bacillus subtilis*, the initial growth of tomato plants of two italian type cultivars, Cardyna and Trindade. The statistic was completely randomized with 3 methods of application are: seed inoculation; watering the seedling transplantation; control without application; in two italian tomato cultivars. 60 days after sowing were evaluated fresh and weight of sheets, stems and roots and also the aerial parts. Irrigation in tomato seedlings with *Bacillus subtilis* promoted increases in average values of fresh weight of plants. The cultivar 'Trindade' presented higher fresh mass accumulation. *Bacillus subtilis* showed no interaction with genotypes for dry weight of leaves and the cultivar 'Trindade' accumulated greater dry weight of leaves. Trinidad accumulated greater dry weight of stems and roots by watering with bacteria already growing Cardyna showed no increase.

Key words: *Solanum lycopersicum* L, biofertilizers, organic, horticulture, bacteria promote plant growth.

3.2 Introdução

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das hortaliças mais importantes e amplamente cultivadas de regiões tropicais e subtropicais do mundo. Seu cultivo tornou-se cada vez mais popular desde meados do século XIX, por causa da sua tolerância climática e bons valores nutritivos. Atualmente o cultivo de tomate é prioritário na horticultura industrial no mundo e tem um lugar distinto no grupo das hortaliças (Walia *et al.*, 2014).

Bacillus e *Pseudomonas* são gêneros de bactérias que fazem parte de um grupo nomeado de BPCP (Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas) que exercem um efeito direto no crescimento de plantas através da produção de fitormônios e também agem na indução de resistência sistêmica contra grande espectro de patógenos de raízes e foliares (Podile & Kishore, 2006).

Mudas de tomateiro tratadas com *B. subtilis* apresentaram incrementos nas raízes e também na parte aérea através da síntese de hormônios relacionados ao crescimento (Chowdappa *et al.*, 2013).

Nesta pesquisa inédita objetivou-se avaliar os efeitos no crescimento inicial das plantas, com aplicação de *Bacillus subtilis* em mudas de tomateiro de duas cultivares do tipo italiano, Cardyna e Trindade, através da inoculação das sementes e rega das mudas no momento do transplante.

3.3 Material e Métodos

O experimento foi conduzido na Área Experimental de Olericultura Orgânica da Universidade Federal do Paraná (UFPR), no município de Pinhais – PR. O clima segundo a classificação de Köppen é temperado, úmido mesotérmico (Cfb).

Foram utilizadas sementes de duas cultivares de tomate tipo italiano, ‘Cardyna’ e ‘Trindade’, da empresa HM. Clause. Cultivar Cardyna descrita como tendo bom vigor de planta, hábito indeterminado, direcionada para cultivo protegido, frutos ovalados com peso de 160-180 gramas, alta resistência à ToMV, V, F 1,2,3, Ff (A,B,C,D,E) M. e resistência intermediária à TSWV, TYLCV. Cultivar Trindade também com bom vigor de planta, boa cobertura foliar e proteção de frutos, para cultivos protegidos e de campo aberto, frutos

ovalados com peso de 160-180 gramas alta resistência à V., Fol. 1,2,3 e ToMV e resistência intermediária à TSWV.

A semeadura foi realizada em bandejas de poliestireno expandido, com 200 células, com volume unitário da célula correspondente a 18 cm³. Estas foram preenchidas com composto a base de esterco de galinha (Provaso[®]) e composto a base de casca de Pinus (Tropstrato HT[®]) na proporção de 1:2. Distribuiu-se uma semente por célula com profundidade de 1 cm. As mudas foram mantidas em cultivo protegido do tipo casa de vegetação com teto e paredes plásticas transparentes à luz visível e com irrigação temporizada com frequência diária através de micro aspersão.

A fonte utilizada para prover a bactéria *Bacillus subtilis* foi o produto comercial Serenade[®] pertencente à Bayer S.A.[®], o qual possui suspensão concentrada aquosa na concentração máxima de endósporos de 13,68 g/L do produto formulado (1,34 % p/v) com o máximo de $1,76 \times 10^{10}$ UFC viáveis/g do produto.

O delineamento da pesquisa foi composto por 3 métodos de aplicação nas 2 cultivares de tomate, sendo estes: inoculação das sementes com 50 µl de Serenade[®] para cada semente, deixadas para secar à sombra em papel toalha e logo após semeadas; e rega das plantas 100 mL de calda por planta (8 mL Serenade[®]/litro de calda) aos 30 DAS (dias após a semeadura) que receberam a calda logo após o seu transplante da bandeja para aos vasos e testemunha que não recebeu aplicação com a bactéria. As mudas foram transplantadas para vasos de 3,6 litros preenchidos com os mesmos substratos e proporção utilizada na produção das mudas.

Ao todo foram 180 plantas de cada cultivar, cada tratamento foi composto por 60 plantas com 4 repetições de 15 plantas, sendo 10 plantas utilizadas para as avaliações.

Aos 60 DAS (dias após semeio) avaliou-se a massa fresca e seca de folhas, caules e raízes e após estes mesmos foram armazenados em sacos de papel Kraft e levados à estufa com circulação de ar forçada, à temperatura de 65°C por 72 horas e em seguida pesados em balança de precisão analítica.

A parte aérea que foi determinada pelo software Win-rhizo[®] v. 4.0, acoplado a um Scanner LA1600 (Regent Systems, Quebec, Canadá) na resolução de 150 dpi (Dots Per Inch ou Pontos Por Polegada).

O delineamento foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial 3 x 2 (3 métodos de aplicação x 2 cultivares) os resultados foram avaliados quanto a normalidade e então, submetidos a análise de variância e quando significativas as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 95% de confiabilidade no programa Assistat[®] 7.7 Beta (Silva & Azevedo, 2002).

3.4 Resultados e Discussão

Não se verificou interação entre os métodos de aplicação e cultivares quanto à massa fresca das folhas, caules e raízes das plantas de tomateiro. Comparando-se os métodos de aplicação, a rega das mudas promoveu maiores valores médios, e comparando-se as cultivares, ‘Trinidade’ apresentou maior acúmulo de massa fresca (Tabela 1).

Tabela 1. Massa fresca das folhas, caules e raízes de tomateiro das cultivares Cardyna e Trinidade submetidas aos métodos de aplicação de *Bacillus subtilis* na forma de inoculação de sementes, rega das mudas e testemunha sem aplicação aos 60 DAS.

	Aplicações			
	Inoculação	Rega	Testemunha	Cultivares
Massa fresca das folhas (g)				
Cardyna	49,82	62,67	45,22	52,57 b
Trinidade	59,55	74,20	66,95	66,90 a
Média (T)	54,68 B	68,43 A	56,08 B	
C.V (%)	14,10			
Massa fresca dos caules (g)				
Cardyna	41,45	56,87	37,85	45,39 b
Trinidade	53,80	75,00	58,40	62,40 a
Média (T)	47,62 B	65,93 A	48,12 B	
C.V (%)	16,44			
Massa fresca das raízes (g)				
Cardyna	13,40	15,56	11,99	13,65 b
Trinidade	16,14	21,38	16,67	18,06 a
Média (T)	14,77 B	18,47 A	14,33 B	
C.V (%)	17,69			

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 95% de confiabilidade.

Os resultados indicam que a rega com *B. subtilis* estimulou o acúmulo de massa fresca durante o crescimento inicial das plantas de tomate, enquanto a aplicação às sementes, apesar de Kumar *et al.* (2013) terem relatado a eficiência desta técnica, não apresentou efeito, sem diferir da testemunha.

Babu *et al.* (2015) observaram ganhos em massa fresca e seca de plantas de tomate tratadas com bactérias promotoras do crescimento das plantas (BPCP) no período de

crescimento inicial, atribuindo esses resultados à melhor eficiência na fotossíntese. Além disso, alguns estudos demonstram que *Bacillus* produtores de auxina trazem benefícios para o tomateiro, inclusive aumentando a massa fresco de parte aérea das plantas (Domenech *et al.*, 2006).

Szilagyi-Zecchin *et al.* (2015) encontraram resultados positivos no crescimento de mudas de tomateiro quando tratadas com bactéria do gênero *Bacillus*. O incremento no desenvolvimento vegetativo das plantas tratadas com BPCP pode ter relação com o alongamento celular promovido pelas auxinas, que proporciona maior plasticidade e alongação celulares, refletindo também em maior crescimento de raízes (Taiz & Ziger, 2009). Segundo Walia *et al.* (2014) auxina é quantitativamente o hormônio mais abundante secretado pelas BPCP e geralmente esse é o principal fator responsável pelo maior desenvolvimento radicular.

A massa seca (Tabela 2) é resultado da atividade fotossintética (Benincasa, 2003) e acúmulo de nutrientes (Oliveira *et al.*, 2002), e expressa também a partição de fotoassimilados nas diferentes partes das plantas (Taiz & Ziger, 2009). Adesemoye *et al.* (2008) relatam que após 60 DAS, mesmo período decorrido na presente pesquisa, a massa seca de plantas de tomate tratadas com *B. subtilis* aumentou significativamente. Entretanto, verifica-se na Tabela 2 que a aplicação com *B. subtilis* não apresentou incremento quanto à massa seca das folhas, enquanto a inoculação das sementes reduziu o valor médio da massa, nesse caso sugerindo interações que implicaram no menor acúmulo de fotoassimilados. Ao se comparar as cultivares, ‘Trinidade’ apresentou maior acúmulo de massa seca nas folhas.

As BPCP podem proporcionar efeito benéfico, neutro ou reduzir o crescimento vegetal (Mafia *et al.*, 2007). Segundo Ferreira *et al.* (2014) as auxinas produzidas por bactérias podem interagir com as plantas e também interferir em processos fisiológicos através da alteração de concentração nas várias partes da planta. Os efeitos do AIA (ácido indol acético) produzido por bactérias pode gerar resultados positivos ou negativos sendo influenciado pela suscetibilidade à alteração de concentração nas várias partes da planta e genótipos (Spaepen *et al.*, 2007). Patten & Glick (1996) também afirmaram que uma quantidade extra de compostos indólicos produzidos pelas bactérias podem modificar as quantidades endógenas na planta e assim induzir um nível ótimo ou acima do mesmo que resulta em indução ou inibição do crescimento vegetal.

Tabela 2. Massa seca das folhas, caules e raízes de tomateiro das cultivares Cardyna e Trindade submetidas aos métodos de aplicação de *Bacillus subtilis* na forma de inoculação de sementes, rega das mudas e testemunha sem aplicação aos 60 DAS.

	Aplicações			
	Inoculação	Rega	Testemunha	Cultivares
Massa seca das folhas (g)				
Cardyna	4,80	5,43	5,45	5,23 b
Trindade	5,92	6,84	6,59	6,45 a
Média (T)	5,36 B	6,13 A	6,02 A	
C.V (%)	2,71			
Massa seca dos caules (g)				
Cardyna	2,99 Cb	5,10 Ab	4,18 Bb	
Trindade	4,48 Ba	5,89 Aa	4,63 Ba	
Média (T)				
C.V (%)	2,73			
Massa seca das raízes (g)				
Cardyna	0,88 Bb	1,03 Ab	0,80 Bb	
Trindade	1,01 Ba	1,21 Aa	1,11 ABa	
Média (T)				
C.V (%)	5,85			

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 95% de confiabilidade.

As interações entre cultivares e métodos de aplicação quanto à massa seca dos caules e raízes indica que o efeito do *B. subtilis* nessas variáveis, pode diferir em função do genótipo. Nota-se essa variação que para a cultivar Trindade houve incremento de massa seca de caules e raízes através da rega com a bactéria, já para a cultivar Cardyna não houve esse mesmo incremento não apresentando influencia da aplicação da bactéria.

Lazzareti & Bettiol (1997) realizaram testes de inoculação com formulados de *B. subtilis* em várias espécies e encontraram respostas positivas apenas no arroz. Isso remete à existência de interação específica entre a bactéria e os genótipos testados, possivelmente relacionados à presença de compostos indólicos e interações com a expressão gênica das cultivares. O método de aplicação de rega com *B. subtilis* proporcionou maior acúmulo de massa seca de raízes. Em outro estudo, o peso seco de raízes de plantas de tomate tratadas

com *B. subtilis* demonstrou incremento de 18% quando comparado com plantas não tratadas com a bactéria (Mena-Violante e Olalde-Portugal, 2007).

Entre cultivares, ‘Cardyna’ não apresentou influencia massa seca de raízes quando tratada com *Bacillus subtilis*, ‘Trinidade’ só apresentou esse mesmo estímulo no método de aplicação de rega.

Uma parte aérea (Tabela 3) maior possibilita eficiência fotossintética que resulta em mais fotoassimilados translocados para órgãos de crescimento ou de reserva nos estádios subsequentes (Taiz & Ziger, 2009).

Tabela 3. Parte aérea (cm²) média por planta de tomateiro das cultivares Cardyna e Trinidade submetidas aos métodos de aplicação de inoculação de sementes, rega das mudas e testemunha sem aplicação aos 60 DAS.

	Parte aérea (cm ²)		
	Inoculação	Rega	Testemunha
Cardyna	2.314 Bb	3.279 Ab	2.428 Ba
Trinidade	3.568 Ba	4.247 Aa	2.034 Ca
C.V (%)	12,51		

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 95% de confiabilidade.

Assim como a massa fresca e massa seca foram estimuladas pelo método de aplicação rega com *Bacillus subtilis* a parte aérea apresentada na tabela acima indica que esse mesmo método de aplicação proporcionou maior parte aérea para ambos os genótipos, ‘Cardyna’ e ‘Trinidade’. Esse aumento de parte aérea também foi registrado na cultura do milho quando tratado com formulado à base de *B. subtilis* (Araujo, 2008). Zhang *et al.* (2008) destacaram que bactérias promotoras do crescimento de plantas propiciam o aumento da eficiência fotossintética e do conteúdo de clorofilas favorecendo o acúmulo energético da planta. Pode se então afirmar que esse é um dos mecanismos que justifica o aumento da parte aérea proporcionado pela aplicação com *Bacillus subtilis*.

O aumento da parte aérea no método de aplicação de rega também pode justificar as alterações observadas em outras variáveis, como o aumento da massa seca de caules e raízes, relacionados à maior área fotossintética e conseqüente maior acúmulo e translocação de fotoassimilados (Szilagyi-Zecchin *et al.*, 2015).

3.5 Conclusões

A aplicação de *Bacillus subtilis* estimula o crescimento inicial de plantas de tomateiro quando aplicado às mudas na forma de rega.

LITERATURA CITADA

ADESEMOYE, A.O.; OBINI, M.; UGOJI, E.O.

2008 Comparison of plant growth-promotion with *pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis* in three vegetables. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39: 423-426.

ARAUJO, F.F.

2008 Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de ostras e desenvolvimento de milho, soja e algodão. *Ciência e Agrotecnologia*, 32:2, 456-462.

BABU, A.N.; JOGAI AH, S.; ITO, S.; NAGARAJ, A.K.; TRAN, L.P.

2015 Improvement of growth, fruit weight and early blight disease protection of tomato plants by rhizosphere bacteria is correlated with their beneficial traits and induced biosynthesis of antioxidant peroxidase and polyphenol oxidase. *Plant Science*, 231: 62-73.

BENINCASA, M. M. P.

2003 *Análise de crescimento de plantas: noções básicas*. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 41 p.

CHOWDAPPA, P.; KUMAR, M.; LASHMI, 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*, 65:109-117.

DOMENECH J.; REDDY, M.S.; KLOEPPER, J.W.; RAMOS, B.; GUTIERREZ-MAÑERO, 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: 245-258.

FERREIRA, E.P.B.; KNUPP, A.M.; MARTIN-DIDONET, C.C.G.

2014 Crescimento de cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) influenciado pela inoculação com bactérias promotoras de crescimento de plantas. *Bioscience Journal*, 30:3, 655-665.

KUMAR, D.; SHIVAY, Y.S.; DHAR, S.; KUMAR, C.

2013 Prasad R. Rhizospheric flora and the influence of agronomic practices on them—a review. *Proceedings of the National Academy of Sciences India. Section B: Biological Sciences*, 83:1, 1-14.

LANNA, R.F.; FERRO, R.; PINHO, R.S.C.

2010 Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. *Revista Trópica*, 4:2, 12p.

LAZZARETI, E.; BETTIOL, W.

1997 Tratamentos de sementes de arroz, trigo, feijão e soja com um produto formulado a base de células e de metabólitos de *Bacillus subtilis*. *Scientia Agricola*, 54:1-2, 89-96.

MAFIA, R.G.; ALFENAS, A.C.; FERREIRA, E.M.; TEIXEIRA, D.A.; ZAUZA, E.A.V.

- 2007 Indução do enraizamento e crescimento do eucalipto por rizobactérias: efeito da adição de fonte alimentar e da composição do substrato de enraizamento. *Revista Árvore*, 31:4, 589-597.
- MENA-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.
- OLIVEIRA, L. E. M.; MESQUITA, A. C.; FREITAS, R. B.
- 2002 *Análise de crescimento de plantas*. UFLA: Lavras, 9 p.
- PATTEN, C.L.; GLICK, B.R.
- 1996 Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology*, 42,207-220.
- PODILE, A. R.; KISHORE, G. K.
- 2006 Plant Growth Promoting Rhizobacteria. In: GNANAMANICKAM, S.S. (Ed.). *Plant-Associated Bacteria*, Springer, Printed in the Netherlands, 195-230.
- SILVA, F.A.S.; AZEVEDO, C.A.V.
- 2002 Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, 4:1, 71-78.
- SILVEIRA, E.B.; RODRIGUES, V.J.L.B.; GOMES, A.M.A.; MARIANO, R.L.R. E MESQUITA, J.C.P.
- 2002 Pó de coco como substrato para produção de mudas de tomateiro. *Horticultura Brasileira*, 20, 211-216.
- SZILAGYI-ZECCHIN, V.J.; MOGOR, A.F.; RUARO L.; RÖDER C.
- 2015 Crescimento de mudas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) estimulado pela bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *Plantarum* FZB42 em cultura orgânica. *Revista de Ciências Agrárias*, 38, 26-33.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E.
- 2009 *Fisiologia vegetal*. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819 p.
- ZHANG, H.; XIE, X.; KIM, M.S.; KORNYEYEV, D.A.; HOLADAY, S.; PARÉ, P.W.
- 2008 Soil bacteria augment Arabidopsis photosynthesis by decreasing glucose sensing and abscisic acid levels in planta. *The Plant Journal*, 56, 264-273.
- WALIA, A.; METHA, P.; CHAUHAN, A.; SHIRKOT, C.K.
- 2014 Effect of *Bacillus subtilis* Strain CKT1 as Inoculum on Growth of Tomato Seedlings Under Net House Conditions. *Biological Sciences*, 84:1,145-155.

**PRODUÇÃO EM ANOS SUCESSIVOS E ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS EM
CULTIVARES DE TOMATEIRO EM SISTEMA ORGÂNICO COM APLICAÇÕES
DE *Bacillus subtilis***

Resumo

Este estudo verificou os efeitos da aplicação da bactéria *B. subtilis*, na produção e alterações bioquímicas do tomateiro. As plantas foram conduzidas sob cultivo protegido por duas safras, em sistema orgânico e receberam aplicações com suspensão concentrada contendo a bactéria *B. subtilis*, produto comercial Serenade[®] na dose de 4 L/ha, a partir dos 21 dias após o transplante até o final do ciclo. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial 4 x 2 (4 formas de aplicação x 2 cultivares) em 4 repetições contendo 5 plantas por parcela. As formas de aplicação foram: rega no colo da planta; pulverização foliar; rega + pulverização foliar e testemunha que não recebeu aplicação, em duas cultivares de tomate do tipo italiano, 'Cardyna' e 'Trinidade'. A aplicação de *B. subtilis* não influenciou na produção de tomate das cultivares 'Cardyna' e 'Trinidade' em safras sucessivas, no entanto estimulou a produção de clorofila *a*, *b*, total e carotenoides, apresentou interações com os genótipos das cultivares utilizadas para o acúmulo de açúcares redutores e não redutores e proporcionou incrementos das enzimas, fenilalanina amônia-liase, quitinase e β -1,3-glucanases, relacionadas com a defesa das plantas. As diferentes formas de aplicação apresentaram interação com os genótipos e com as variáveis.

Palavras-chave: tomate; crescimento; enzimas; *Solanum lycopersicum* L; produtividade.

Abstract

This study evaluated the effects of *B. subtilis* application, at the production and biochemical changes of tomato plants. Plants were cultivated in greenhouse for two crops, in an organic system receiving applications with concentrated suspension containing *B. subtilis*, commercial product Serenade[®], from 21 days after transplantation until the end of the cycle. . The experimental design was completely randomized in a factorial arrangement 4 x 2 (4 x 2 application forms cultivars) in 4 replicates and 5 plants per plot. The application forms were: irrigation in plant lap, foliar spraying, irrigation and foliar spray and control without application, in two italian-type tomato cultivars 'Cardyna' and 'Trinidade'. The application of *B. subtilis* did not influence at the production of both tomato cultivars 'Cardyna' and 'Trinidade' in successive crops. Stimulated the production of chlorophyll *a*, *b*, and total carotenoid presented interactions with genotypes of the cultivars used for the accumulation of reducing sugars and not reducers and provided increments enzyme, phenylalanine ammonia lyase, chitinase and β -1,3-glucanases, relating to the protection of plants. The application forms have different interaction with genotypes and variables.

Keywords: tomato; growth; enzymes; *Solanum lycopersicum* L; productivity.

4.1 Introdução

O uso de microrganismos endofíticos como bactérias promotoras do crescimento de plantas é uma opção que atende aos critérios de sustentabilidade na produção de alimentos, sendo uma opção para a redução no uso de produtos químicos (SHAHAROONA *et al.*, 2008).

Bacillus compõe um gênero de bactérias que é conhecido por promover o crescimento vegetal e também por ser utilizado mundialmente em formulações de biofertilizantes e inoculantes (BASHAN & BASHAN, 2005).

Adesemoye *et al.* (2008) afirmaram que o gênero *Bacillus* é um dos mais amplamente reportados como sendo do grupo das bactérias BPCP (Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas). O impacto dessas mesmas sobre o crescimento ou a sanidade das plantas pode ser classificado como neutro, deletério ou benéfico (KLOEPPER *et al.*, 1989).

A fim de tornar o cultivo de tomate sustentável e menos dependente de fertilizantes químicos, é importante saber como utilizar as BPCP que podem contribuir através de vários sítios de ação para a melhoria do crescimento do tomateiro (WALIA *et al.*, 2014).

Atualmente, produtos a base de *B. subtilis* se mostram eficientes na fitossanidade e também promovem o crescimento das mesmas (LANNA *et al.*, 2010). A indução da síntese das PR- proteínas quitinases e β -1,3-glucanases em tomateiro foram observadas com rega e pulverização foliar com *B. subtilis* indicando potencial ativação de defesa das plantas (RAMYABHARHATHI *et al.*, 2012).

Plantas tratadas com *Bacillus* spp. apresentam folhas com maiores concentrações de clorofila (GROVER *et al.*, 2014). *Bacillus subtilis* tem demonstrado ação na indução de resistência de plantas. A promoção de crescimento e também a potencial indução da resistência sistêmica têm sido demonstrada em mudas de tomateiro tratadas com *B. subtilis* apresentando maiores níveis de enzimas relacionadas à defesa (CHOWDAPPA *et al.*, 2013).

Os indutores ou elicitores são produtos de origem biótica ou abiótica que, quando aplicados em plantas, induzem respostas de defesa de diversas enzimas (BORSATTI *et al.*, 2015) incluindo síntese de proteínas, alterações nas enzimas fenilalanina amônia-liase, glucanase e quitinases (DURRANT & DONG, 2004) que podem resultar em ganhos ou perdas na produção.

Nesse contexto, o trabalho objetivou avaliar os efeitos da aplicação da bactéria *B. subtilis* na produção e alterações bioquímicas nas plantas de tomateiro.

4.2 Material e métodos

Implantação do experimento

O experimento foi conduzido na Área Experimental de Olericultura Orgânica da Universidade Federal do Paraná (UFPR), no município de Pinhais – PR.

Antes da implantação do experimento foi realizada análise de solo da área para profundidade de 0-20 cm apresentando os seguintes resultados, pH (CaCl₂) = 5,5 ; pH SMP = 6,6 ; Al⁺³ = 0 ; H + Al = 2,2 cmolc dm⁻³ ; Ca⁺² = 8,0 cmolc dm⁻³ ; Mg⁺² = 4,1 cmolc dm⁻³ ; K⁺² = 1,45 cmolc dm⁻³ ; P = 38,3 cmolc dm⁻³ ; C = 38 g dm⁻³ ; V% = 86 ; CTC = 15,75 cmolc dm⁻³ (Unithal Tecnologia e Comércio de Produtos Agropecuários Ltda). Antes do plantio foi aplicado ao solo a quantidade equivalente a 5 t ha⁻¹ de composto orgânico apresentando os seguintes teores: pH 7,1; P= 14,00 g Kg⁻¹; K= 11,3 g Kg⁻¹; Ca= 31,7 g Kg⁻¹; Mg= 6,8 g Kg⁻¹; e relação C:N = 27,6. O resultado da análise de solo de acordo com os parâmetros citados a cima indica um solo de boa fertilidade para cultivo.

O cultivo foi feito em ambiente protegido em estufa do tipo túnel alto, com 200 plantas utilizando o espaçamento de 0,65 m entre plantas e 1,20 m entre linhas, resultando em uma população de 12.820 plantas por hectare. A semeadura ocorreu em setembro de 2013 e o transplante das mudas em outubro de 2013 aos 45 dias após a semeadura. O experimento foi repetido no ano subsequente no mesmo local, período e manejo. Foi realizada a retirada das folhas abaixo das ráquis colhidas como manejo fitossanitário preventivo.

Em cada experimento foram implantadas 32 parcelas com 5 plantas. Implantou-se também uma linha de plantas como bordadura em cada lateral da estufa agrícola.

Foram utilizadas sementes de duas cultivares de tomate tipo italiano, ‘Cardyna’ e ‘Trinidade’, pertencentes à empresa HM. Clause. Cultivar Cardyna descrita como tendo bom vigor de planta, hábito indeterminado, direcionada para cultivo protegido, frutos ovalados com peso de 160-180 gramas, alta resistência à ToMV, V, F 1,2,3, Ff (A,B,C,D,E) M. e resistência intermediária à TSWV, TYLCV. Cultivar Trinidade também com bom vigor de planta, boa cobertura foliar e proteção de frutos, para cultivos protegidos e de campo aberto, frutos ovalados com peso de 160-180 gramas alta resistência à V., Fol. 1,2,3 e ToMV e resistência intermediária à TSWV.

Tratamentos e delineamento experimental

O produto Serenade[®] (Bayer S.A.[®]) é uma suspensão concentrada aquosa na concentração máxima de endósporos de 13,68 g/L do produto formulado (1,34 % p/v) com o máximo de $1,76 \times 10^{10}$ UFC viáveis/g do produto (SEAB, 2016).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial 4 x 2 (4 formas de aplicação x 2 cultivares) em 4 repetições contendo 5 plantas por parcela. As formas de aplicação: (T1) aplicação na forma de rega no colo da planta (soil drench); (T2) pulverização foliar da planta; (T3) rega + pulverização foliar da planta; (T4) testemunha que não recebeu aplicação. A dose que foi utilizada do produto Serenade[®] foi de 4 litros por hectare, ou seja, 4 mL Serenade/L de calda, que é a dose máxima recomendada pelo fabricante.

As aplicações tiveram início aos 21 dias após a semeadura com frequência semanal, se estendendo até o fim do cultivo em março do ano posterior, totalizando 16 aplicações. Utilizou-se pulverizador pressurizado por CO₂, com pressão constante de 3,16 kgf cm⁻², proporcionando cobertura uniforme de pulverização e evitando o escorrimento e deriva.

Avaliações de produção

A colheita iniciou-se aos 106 dias após a semeadura na safra de 2013/2014 e aos 109 dias após a semeadura na safra de 2014/2015. Foram colhidos e avaliados todos os frutos de 10 ramos e após este realizado o despolpa como forma de determinar o crescimento da planta. Cada fruto foi colhido e avaliado quando apresentava 2/3 de sua coloração avermelhada, foi medido o diâmetro equatorial e longitudinal e também sua massa fresca em gramas.

Avaliações bioquímicas

As análises bioquímicas foram realizadas no segundo ano de cultivo com a folha coletada no primeiro horário da manhã, entre 7 e 8 horas, aos 116 dias após a semeadura, imediatamente acima do 7º ramo, referente ao terço mediano da planta. Foram retirados os folíolos das extremidades e recortados os folíolos medianos, que foram congelados e depois macerados com nitrogênio líquido e armazenados sob congelamento para as posteriores análises. Foram utilizadas triplicatas para obtenção de médias.

Para extração de clorofila *a* (663nm), clorofila *b* (647 nm) e carotenoides (470 nm) utilizou-se a metodologia descrita por POMPELLI *et al.* (2012) usando acetona e carbonato de cálcio realizando a leitura em espectrofotômetro (BEL 2000 UV-Vis).

A determinação de açúcares redutores e não redutores foi feita pelo método DNS que é baseado na reação entre o açúcar redutor e o ácido 2,5-dinitrosalicílico, o ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, oxidando o açúcar redutor (MALDONADE *et al.*, 2013).

Os compostos fenólicos foram determinados pela adaptação do método Azul da Prússia descrito por LUCAS *et al.* (2000), em que a mistura de ferrocianeto e cloreto férrico na reação colorimétrica proporciona uma coloração azul que é proporcional à quantidade de compostos fenólicos presentes na amostra (PRICE & BUTLER, 1977).

Os teores de flavonoides foram determinados a partir do método adaptado de Eghdami & Sadeghi (2010) que se baseia na formação de complexos que reagem com o alumínio.

Na UTFPR campus de Dois Vizinhos – PR foi realizada a determinação de proteínas, e a atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase (FAL), quitinase e β -1,3-glucanases.

Para a determinação da concentração de proteínas totais, utilizou-se a adaptação do método descrito por Bradford (1976) em que a leitura de proteínas totais foi realizada em espectrofotômetro a 590 nm, utilizando soro albumina bovina como padrão.

A determinação da atividade da fenilalanina amônia-liase (FAL) foi realizada com base na diferença de absorvância resultante da conversão da fenilalanina em ácido trans-cinâmico (KUHN, 2007). Para a determinação das atividades de quitinases e β -1,3-glucanases seguiu-se os procedimentos descritos por Wirth & Wolf (1992) com adaptações. Sendo que a atividade enzimática da quitinase foi avaliada através da liberação de oligômeros solúveis de “chitin-azure”, a partir de quitina carboximetilada marcada com remazol brilhante violeta 5R - RBV (Sigma Aldrich®) (BUSSO & MAZARO, 2015). Para determinação espectrofotométrica das atividades de β -1,3-glucanase nos extratos foi utilizado como substrato curdlan-remazol azul brilhante (Sigma Aldrich® - 4 mg ml⁻¹)

Análises estatísticas

A análise estatística da parte de produção foi inteiramente casualizada em arranjo fatorial 2 x 2 (2 anos de produção x 2 cultivares) com 4 repetições por tratamento.

O delineamento experimental da parte bioquímica foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial 4 x 2 (4 formas de aplicação x 2 cultivares) sendo 4 repetições por tratamento.

Procedeu-se a análise de variância tanto para a parte de produção como para parte bioquímica, e quando significativa as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 95% de confiabilidade utilizando-se o programa Assistat® 7.7 Beta (Silva & Azevedo, 2002).

4.3 Resultados

Não se verificou interação entre cultivares e formas de aplicação. As aplicações com *Bacillus subtilis* não promoveram alterações nas variáveis biométricas dos frutos e de produção das cultivares, entretanto diferenças entre as cultivares foram observadas (Tabela 1).

Tabela 1. Quadro resumo da análise de variância Significâncias (valores de F) das variáveis de produção diâmetros equatorial e longitudinal, peso médio de frutos, número de frutos total e produção por planta de tomate tipo italiano das cultivares Cardyna e Trindade médias das duas cultivares em dois anos de cultivo, safra 2013/2014 e safra 2014/2015.

	Tratamentos	Cultivares	Interação
Safra 2013\14			
Diâmetro equatorial	0,2902 ^{ns}	5,9239 *	0,1833 ^{ns}
Diâmetro longitudinal	0,2051 ^{ns}	0,2049 ^{ns}	0,2855 ^{ns}
Massa média de frutos	0,2150 ^{ns}	3,1537 ^{ns}	0,2468 ^{ns}
Número de frutos	1,0523 ^{ns}	0,4542 ^{ns}	1,0673 ^{ns}
Produção por planta	0,2413 ^{ns}	3,7422 ^{ns}	0,3170 ^{ns}
Safra 2014\15			
Diâmetro equatorial	0,4544 ^{ns}	40,3763 **	0,5160 ^{ns}
Diâmetro longitudinal	0,2855 ^{ns}	22,7567 **	0,3471 ^{ns}
Peso médio de frutos	0,1317 ^{ns}	31,7506 **	0,2032 ^{ns}
Número de frutos	0,6492 ^{ns}	41,5798 **	0,2388 ^{ns}
Produção por planta	0,2637 ^{ns}	0,0164 ^{ns}	0,0454 ^{ns}

** significativo ao nível de 1% de probabilidade

* significativo ao nível de 5 % de probabilidade

ns não significativo

As médias dos diâmetros equatorial e longitudinal (Tabela 2) não sofreram influência da aplicação de *Bacillus subtilis*, entretanto houve diferença entre cultivares.

Tabela 2. Diâmetros equatorial e longitudinal em mm dos frutos de tomate tipo italiano das cultivares Cardyna e Trinidad. Médias das duas cultivares em dois anos de cultivo, safra 2013/2014 e safra 2014/2015.

	Cultivares		
	Cardyna	Trinidad	C.V (%)
Safra 2013/14			
Diâmetro Equatorial	53,35 b	55,69 a	4,98
Diâmetro Longitudinal	66,75 a	67,25 a	4,69
Safra 2014/15			
Diâmetro Equatorial	52,99 b	55,64 a	2,17
Diâmetro Longitudinal	64,63 b	67,19 a	2,30

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 95% de confiabilidade.

Na primeira safra (2013-2014) a massa média dos frutos (Tabela 3) de ambas as cultivares não apresentou diferença significativa entre cultivares ou sequer interação com as formas de aplicação da bactéria. Na safra posterior (2014-2015) a cultivar ‘Cardyna’ apresentou massa média de frutos menores do que os frutos da cultivar ‘Trinidad’.

Tabela 3. Massa média e número de frutos de tomate tipo italiano das cultivares Cardyna e Trinidad. Médias das duas cultivares em dois anos de cultivo, safra 2013/2014 e safra 2014/2015.

	Cultivares		
	Cardyna	Trinidad	C.V (%)
Massa média (g)			
Safra 2013/14	107,52 a	115,61 a	11,55
Safra 2014/15	98,32 b	113,06 a	7,00
Número de frutos			
Safra 2013/14	52,22 a	52,04 a	5,51
Safra 2014/15	55,33 a	48,02 b	6,21

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 95% de confiabilidade.

O número de frutos (Tabela 3) da primeira safra foi estatisticamente igual, já na segunda safra o número de frutos da cultivar ‘Cardyna’ se mostrou superior à cultivar ‘Trinidad’.

A média de produção por planta na primeira safra 2013/2014 foi de 4,8 kg/planta para cultivar ‘Cardyna’ e 5,4 kg/planta para cultivar ‘Trinidade’, no segundo ano de safra 2014/2015 a média foi de 5,4 kg/planta ‘Cardyna’ e 5,4 kg/planta ‘Trinidade’. A comparação de médias não identificou diferenças na produção total nos dois anos entre cultivares e entre anos.

Variáveis Bioquímicas

Tabela 4. Quadro resumo da análise de variância (valores de F) das variáveis de clorofila a, b e total e carotenoides (mg por grama de material vegetal) de folhas de tomate tipo italiano das cultivares Cardyna e Trinidade.

	Tratamentos	Cultivares	Interação
Clorofila a	15,7579 **	26,3499 *	0,1299 ^{ns}
Clorofila b	4,818 *	9,4240 **	0,1294 ^{ns}
Clorofila total	9,2533 **	18,4068 **	0,1247 ^{ns}
Carotenoides	24,9458 **	30,3259 **	1,2482 ^{ns}

** significativo ao nível de 1% de probabilidade

* significativo ao nível de 5 % de probabilidade

ns não significativo

Não se verificou interação entre formas de aplicação e cultivares quanto aos pigmentos foliares testados (Tabela 4), entretanto ocorreram diferenças entre formas de aplicação e cultivares (Tabela 5).

Os valores apresentados na Tabela 5 demonstram que a aplicação foliar de *Bacillus subtilis* estimulou a síntese de clorofila a, b, total e também carotenoides. Quanto às cultivares, ‘Cardyna’ se comparada com ‘Trinidade’, apresentou maior teor dos pigmentos relacionados na tabela anterior.

A quantidade de açúcares totais não foi influenciada pelas formas de aplicação e também não apresentou diferença significativa entre as cultivares, suas médias foram de 7352 µg/g ‘Cardyna’ e 6961 µg/g ‘Trinidade’. Os açúcares redutores (Tabela 6) da cultivar ‘Cardyna’ não apresentaram incremento pela aplicação bactéria, porém quando aplicado em rega + pulverização foliar induziu maior acúmulo de açúcares redutores na cultivar ‘Trinidade’.

Tabela 5. Valores médios de Clorofila a, b, total e carotenoides (mg por grama de material vegetal) de folhas de tomate tipo italiano das cultivares Cardyna e Trinidad.

	Clorofila a	Clorofila b	Clorofila Total	Carotenoides
Formas de aplicação				
Testemunha	0,225 b	0,135 b	0,360 b	0,140 b
Pulverização foliar	0,274 a	0,170 a	0,444 a	0,183 a
Rega + pulverização foliar	0,207 b	0,144 ab	0,352 b	0,140 b
Rega	0,218 b	0,156 ab	0,375 b	0,149 b
Cultivares				
Cardyna	0,250 a	0,162 a	0,421 a	0,164 a
Trinidad	0,212 b	0,135 b	0,353 b	0,141 b
C.V %	7,82	11,03	8,78	6,57

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 95% de confiabilidade.

Tabela 6. Valores de açúcares redutores e não redutores em μg por grama de material vegetal, de folhas de tomate tipo italiano das cultivares Cardyna e Trinidad.

	Formas de aplicação			
	Rega	Pulverização foliar	Rega + Pulverização foliar	Testemunha
Açúcares redutores ($\mu\text{g/g}$)				
Cardyna	5803 Aa	4420 Ba	5341 ABb	5930 Aa
Trinidad	4329 Bb	5083 Ba	6810 Aa	5223 Ba
Média (T)				
C.V %	9,03			
Açúcares não redutores ($\mu\text{g/g}$)				
Cardyna	1619 Bb	2100 ABa	1666 Ba	2259 Aa
Trinidad	2483 Aa	1747 Ba	896 Cb	1768 Bb
Média (T)				
C.V %	12,57			

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 95% de confiabilidade.

O acúmulo de açúcares não redutores da cultivar ‘Cardyna’ não foi estimulado pela aplicação de *B. subtilis* enquanto que para ‘Trinidade’ a aplicação na forma de rega proporcionou aumento desses açúcares e o tratamento de rega + pulverização foliar ocasionou a diminuição dos açúcares não redutores.

O acúmulo de compostos fenólicos não apresentou diferença ou interação entre as vias de aplicação ou cultivares, ‘Cardyna’ apresentou valor médio 3990 e ‘Trinidade’ 4127 mg de compostos fenólicos por grama de material vegetal.

Da mesma forma, os teores de flavonoides não expressaram diferenças entre as formas de aplicação ou cultivares, com ‘Cardyna’ apresentando 1875 mg e ‘Trinidade’ 1873 mg de flavonoides por grama de material vegetal.

A quantidade de proteínas (Tabela 7) não foi influenciada pela aplicação de *B. subtilis*, porém, comparando-se as cultivares, ‘Cardyna’ apresentou valor superior ao de ‘Trinidade’.

Tabela 7. Valores de proteínas livres totais em folhas de tomate tipo italiano das cultivares Cardyna e Trinidade.

	Cultivares		
	Cardyna	Trinidade	C.V (%)
Proteínas (mg/g)	1,70 a	1,46 b	11,82

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 95% de confiabilidade.

Foi apontada a maior atividade (Tabela 8) de FAL em diferentes formas de aplicação para cada cultivar. ‘Cardyna’ obteve o resultado superior com pulverização foliar enquanto ‘Trinidade’ apresentou superioridade na aplicação de rega + pulverização foliar, nota-se que em ambos os resultados a pulverização foliar está presente.

Tabela 8. Valores de fenilalanina amônia-liase (FAL) em UAbs/min/mg proteína de folhas de tomate tipo italiano das cultivares Cardyna e Trinidade.

	Tratamentos			
	Rega	Pulverização foliar	Rega + Pulverização foliar	Testemunha
Cardyna	0,0504 ABa	0,0611 Aa	0,0470 Bb	0,0436 Ba
Trinidade	0,0515 Ba	0,0533 Ba	0,0757 Aa	0,0466 Ba
C.V %	11,43			

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 95% de confiabilidade.

A atividade das quitinases quando rega com *B. subtilis* na cultivar ‘Cardyna’ é superior estatisticamente as demais vias de aplicação, enquanto que para ‘Trinidade’ a pulverização foliar obteve essa mesma superioridade (Tabela 9).

Tabela 9. Valores de quitinase em U.E.mg.proteína de folhas de tomate tipo italiano das cultivares Cardyna e Trinidade.

	Tratamentos			
	Rega	Pulverização foliar	Rega + Pulverização foliar	Testemunha
Cardyna	1,2478 Aa	0,9770 Bb	0,9558 Ba	0,6646 Cb
Trinidade	1,2824 Ba	1,9855 Aa	1,0490 Ca	1,0092 Ca
C.V %	6,21			

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 95% de confiabilidade.

Os valores médios da glucanase (Tabela 10) indicaram interação, com a cultivar ‘Cardyna’ exibindo maior valor para aplicação na forma de rega, e ‘Trinidade’ mostrou maior média com a pulverização foliar.

Tabela 10. Valores de β -1,3-glucanases em U.E/mg.proteína de folhas de tomate tipo italiano das cultivares Cardyna e Trinidade.

	Tratamentos			
	Rega	Pulverização foliar	Rega + Pulverização foliar	Testemunha
Cardyna	0,0134 Aa	0,0127 ABb	0,0110 Ba	0,0083 Cb
Trinidade	0,0129 Ba	0,0165 Aa	0,0122 Ba	0,0123 Ba
C.V %	8,97			

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 95% de confiabilidade.

4.4 Discussão

Produção e variáveis biométricas dos frutos

A aplicação de *B. subtilis* não alterou o tamanho de frutos de tomate. Ao se comparar as cultivares, os da ‘Trinidade’ são maiores do que os frutos da cultivar ‘Cardyna’. O trabalho

de Shirahige *et al.* (2010) também confirma que o tamanho dos frutos de tomate italiano é influenciado pelo genótipo de cultivar em questão e que os valores encontrados em doze cultivares testadas variaram de 49 a 64 mm de diâmetro equatorial e de 61 a 99 mm para diâmetro longitudinal, admitindo os valores médios encontrados nesta atual pesquisa.

No trabalho de Rosa *et al.* (2011) a massa média dos frutos de tomate tipo italiano variou entre 83 g e 160 g entre diferentes cultivares, valores próximos aos encontrados nessa pesquisa.

Olivares *et al.* (2015) e Babu *et al.* (2015) verificaram ganhos em biomassa de frutos de tomate tratados com bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP), observação que não se repetiu no presente trabalho.

Verificou-se que a cultivar 'Cardyna' apresentou maior número de frutos na segunda safra, justificando o menor massa média dos frutos obtidos nessa mesma safra.

A produção obtida por planta nessa pesquisa variou de 4,8 a 5,4 Kg planta, sendo superior ao valor citado por Luz *et al.* (2007), no sistema convencional, de três a cinco quilos por planta, e no sistema orgânico a produção de quatro quilos por planta, sem muita variação.

Realizando um cálculo de extrapolação considerando a média de produção obtida por planta nessa pesquisa resulta-se em produtividade de 65 t/ha de tomate orgânico, comparando-se com a média citada acima no sistema convencional essa produtividade é de 51 t/ha, ou seja, destaca-se a superior produção com excedente de 14 t/ha alcançado nesse trabalho.

Não houve influência das diferentes formas de aplicação realizadas com *B. subtilis* no número de frutos, diâmetros equatorial e longitudinal, massa de frutos e produção por planta, indicando que a bactéria não influenciou na produtividade.

A não alteração dos parâmetros relacionados à produtividade são muito importantes, pois demonstrou não haver perdas metabólicas o que poderiam resultar na redução de produtividade. Haja vista que os mesmos substratos do metabolismo primário que ativam rotas de crescimento e desenvolvimento vegetal como o fosfoenolpirvato da rota da glicólise ou eritrose-4-fosfato das pentoses são responsáveis para suprirem de energia o metabolismo secundário como no caso a rota dos fenilpropanóis cuja enzima chave é a fenilalanina amônia-liase.

Variáveis bioquímicas

A aplicação de *B. subtilis* na forma de pulverização foliar estimulou a produção de clorofila *a*, *b* e total. O aumento do teor de clorofila em plantas de tomate também foi relatado

por Szilagyi-Zecchin *et al.* (2015), relacionado ao uso bactérias do gênero *Bacillus*. As clorofilas estão nos cloroplastos das folhas e em outros tecidos, a clorofila *a*, mais abundante, realiza a fase fotoquímica da fotossíntese e a clorofila *b* é responsável por absorver a luz e transportar energia para centros de reação (STREIT *et al.*, 2005).

Assim como as clorofilas, os carotenoides também apresentaram maior concentração com a aplicação foliar de *B. subtilis*, resultado também obtido por Majdah & Tuwaijri (2009), em que plantas tratadas com *Bacillus subtilis* apresentaram maiores níveis de clorofila e carotenoides. Yoshida *et al.* (2009) afirmam que *B. subtilis* pode estimular o aumento dos teores de pigmentos foliares, como observado no presente trabalho.

O aumento dos teores dos pigmentos acima discutidos remete à melhor eficiência da fotossíntese, favorecendo maior aproveitamento de recursos energéticos direcionados para a planta.

Entre as cultivares, ‘Cardyna’ apresentou maior acúmulo dos pigmentos quando comparada com ‘Trinidade’, isso indica uma característica do genótipo, já que não houve influencia das formas de aplicação.

Os açúcares possuem função essencial em todos os estágios do ciclo de vida da planta, participando de processos moleculares, bioquímicos e fisiológicos (SMEEKENS, 2000). A associação planta-bactéria pode proporcionar a ativação de várias vias metabólicas de sacarose que é o principal açúcar não redutor, glicose e frutose sendo essa uma das razões para o estímulo ao crescimento das plantas segundo Kang *et al.* (2014). Os autores relataram que plantas tratadas com bactérias do grupo de BPCP obtiveram aumento nos níveis de clorofila, açúcares totais e açúcares redutores.

Os açúcares redutores são os primeiros produtos fotossintéticos que estão envolvidos na resposta ao estresse, são sintetizados fora do cloroplasto via redutase ou redutase e fosfatase (MOING, 2000).

Entretanto, nesta pesquisa as alterações nas clorofilas promovida pelo aplicação de *B. subtilis* não foi suficiente para também promover o aumento da quantidade de açúcares totais, que não foi influenciada pelas vias de aplicação ou cultivares. Já quanto aos açúcares redutores, *B. subtilis* não estimulou a produção destes na cultivar ‘Cardyna’, porém quando aplicado em rega + pulverização foliar induziu maior acúmulo de açúcares redutores na cultivar ‘Trinidade’, indicando assim a interação com o genótipo.

Bacillus subtilis não exerceu influencia quanto aos açúcares não redutores na cultivar ‘Cardyna’, ao mesmo tempo em que para ‘Trinidade’, a aplicação na forma de rega estimulou o acúmulo desses, enquanto a rega + pulverização, por outro lado, provocou diminuição do

acúmulo de açúcares não redutores. Assim, da quantidade total de açúcares nas formas de aplicação e cultivares, a maior fração foi de redutores.

O aumento de açúcares redutores em relação aos não redutores indica uma inversão no processo de armazenamento e, portanto, um aumento da respiração (KUHN, 2007). Mazaro *et al.* (2009) afirmam que o aumento dos açúcares redutores pode estar relacionado com o aumento da atividade metabólica pela indução à produção de compostos relacionados a expressão da resistência às doenças.

De acordo com RANDHIR *et al.* (2004), os compostos fenólicos são originados no metabolismo secundário das plantas, importantes para o crescimento, sendo também sintetizados em resposta a patógenos. Portanto, pelos resultados obtidos pode-se inferir que as plantas de tomate não receberam estímulos para o aumento dos compostos fenólicos com a aplicação de *Bacillus subtilis*. Esse mesmo resultado se repete com os flavonoides que possuem função antioxidante por sequestrar radicais livres, e também proteção contra patógenos (HEIM *et al.*, 2002).

Verifica-se que a maior síntese de compostos fenólicos e flavonoides não foi estimulada. Portanto *B. subtilis* não exerceu efeito sinalizador/ promotor da síntese dos compostos nas formas como foi aplicado, apesar desse efeito ter sido relatado por Ownley & Windham (2010). A estrutura dos flavonoides é baseada em anéis fenólicos, indicando associação entre os compostos (CAMPBELL & FARREL, 2007), ambos atuam na rota do ácido chiquímico relacionado à resistência sistêmica induzida.

A fenilalanina amônia-liase (FAL) faz parte do metabolismo secundário das plantas, influencia na síntese de ácido salicílico, fenilpropanóis, flavonoides e fitoalexinas (GERASIMOVA *et al.*, 2005). Apesar de sua atuação na rota de compostos fenólicos e flavonoides, ambos não apresentaram diferença como discutido anteriormente.

A indução de defesa aciona mecanismos que já existem na planta, e são ativados em resposta a tratamentos com agentes bióticos e abióticos (CARVALHO, 2012). Esses mecanismos podem envolver compostos fenólicos, β -1,3-glucanases, quitinase, fenilalanina amônia-liase e polifenoxidase (CAVALCANTI *et al.*, 2006).

Esse resultado também se repete para as proteínas livres totais, que não foram afetadas pelas formas de aplicação, e que estão associadas com resistência através de produção de izoenzimas (LAWRENCE *et al.*, 2000). Todavia houve diferença entre as cultivares sendo 'Cardyna' a que apresentou maior teor. As enzimas fazem parte do grupo das proteínas e tem função de catalisar reações químicas.

A alteração na atividade de determinadas PR-proteínas como a fenilalanina amônia-liase, as β -1,3-glucanases e as quitinases podem permitir o acompanhamento do estado de resistência da planta quando exposta a patógenos (BAYSAL *et al.*, 2003).

A aplicação de *B. subtilis* incrementou os valores FAL, e a forma de aplicação por pulverização foliar demonstra ser um método eficiente relacionado a essa enzima, concordando com Olivares *et al.* (2015) ao enfatizarem que a pulverização foliar de plantas com BPCP promove o incremento na atividade da FAL. O comportamento da enzima apresentou diferentes interações entre formas de aplicação e cultivares indicando assim influencia do genótipo.

A utilização desses agentes bióticos como as bactérias representam indutores da resistência sistêmica adquirida, em que ocorre a síntese de PR-proteínas que estão envolvidas na defesa das plantas (CHOUDHARY *et al.*, 2007), entre estas se destacam as quitinases e de β -1,3-glucanases.

As quitinases estimulam a hidrólise das ligações β -1,4 das N-acetilglicosaminas, que são componentes da quitina das paredes celulares dos fungos (WU & BRADFORD, 2003). Os valores de quitinase apresentaram diferentes resultados de acordo com a cultivar. Esse comportamento é relatado por Lawrence *et al.* (2000) ao citarem que linhagens de tomate com resistência ao fungo *Alternaria solani* apresentaram maiores valores de quitinase e de β -1,3-glucanases do que em cultivares que eram suscetíveis, e essas características de resistência e suscetibilidade variaram de acordo com a cultivar. No presente trabalho, ambas cultivares não possuem resistência ao fungo *Alternaria solani*.

As β -1,3-glucanases hidrolisam β -1,3-glucanas das paredes celulares e dos esporos de fungos (WU & BRADFORD, 2003). Segundo Lawrence *et al.* (2000) há sinergia entre quitinase e as β -1,3-glucanases e isso é demonstrado nesse estudo, pois o tratamento que propiciou o aumento das quitinases, também promoveu o aumento das β -1,3-glucanases de forma variável entre formas de aplicação e cultivares, com a rega promovendo a maior média para 'Cardyna', e pulverização foliar em 'Trinidade', indicando que *B. subtilis* estimulou o acúmulo de β -1,3-glucanases, mesmo em plantas que não apresentaram sintomas de doenças.

A indução de resistência na planta pode gerar custos energéticos, que são considerados efeitos negativos resultantes da adaptabilidade que a planta precisa realizar, como a alocação de carbono, pelo estímulo à respiração celular, em detrimento ao acúmulo de reservas (HEIL & BALDWIN, 2002), a exemplo do aumento dos açúcares redutores em relação aos não redutores observado nessa pesquisa em função das aplicações com *Bacillus subtilis*. No entanto, tais alterações não resultaram em perda metabólica.

Carvalho (2012) afirmou que plantas estimuladas a ativar mecanismos de defesa mesmo sem a presença de patógenos, terão custos metabólicos que refletirão na redução da produtividade. Contudo, a produtividade de ‘Cardyna’ e ‘Trinidade’ não foram afetados pelas formas de aplicação com *B. subtilis* apesar da ativação de mecanismos de defesa.

Foram estimulados pela aplicação de *B. subtilis* clorofila *a*, *b* total e carotenoides, os açúcares redutores e não redutores na cultivar ‘Trinidade’, não apresentando esse mesmo estímulo na cultivar ‘Cardyna’. Também as enzimas/PR-proteínas relacionadas com a defesa das plantas, a fenilalanina amônia-liase, as β -1,3-glucanases e as quitinases, foram aumentadas com a aplicação de *B. subtilis* sem influência na produção, por dois anos consecutivos. Quanto às vias de aplicação, foi apresentado interações com as cultivares e com as variáveis.

4.5 Conclusões

A aplicação da bactéria não influenciou a produção do tomateiro, não impactando no número, tamanho, tamanho e massa de frutos e também na produção total por planta.

Bacillus subtilis promoveu alterações bioquímicas nas plantas, como o incremento nos níveis de clorofila *a*, *b*, total e carotenoides sendo que os maiores incrementos ocorreram na forma de aplicação de pulverização foliar.

O acúmulo de açúcares totais não apresentou influência das formas de aplicação ou interação entre cultivares. *Bacillus subtilis* não induziu o acúmulo de açúcares redutores e não redutores na cultivar ‘Cardyna’ entretanto a cultivar ‘Trinidade’ apresentou maior acúmulo de açúcares redutores quando recebeu rega + pulverização foliar e maior acúmulo de açúcares não redutores com o tratamento de rega.

Nota-se a interação entre o genótipo e as formas de aplicação, indicando assim resultados diferentes para uma mesma espécie.

Os compostos fenólicos e flavonoides não sofreram influencia da aplicação de *Bacillus subtilis*. Os valores de proteínas se diferenciaram entre cultivares não sendo influenciados pela aplicação de *Bacillus subtilis*.

As enzimas como fenilalanina amônia-liase e as PR-proteínas como quitinases e β -1,3-glucanases, que estão presentes no sistema de defesa das plantas, foram incrementadas de acordo com o genótipo. As vias de aplicação apresentaram interação quanto as cultivares e as variáveis analisadas.

Referências

- Adesemoye AO, Obini M, Ugoji EO. 2008. Comparison of plant growth-promotion with *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis* in three vegetables. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39:423-426.
- Babu AN, Jogaiah S, Ito S, Nagaraj AK, Tran LP. 2015. Improvement of growth, fruit weight and early blight disease protection of tomato plants by rhizosphere bacteria is correlated with their beneficial traits and induced biosynthesis of antioxidant peroxidase and polyphenol oxidase. *Plant Science*, 231:62-73.
- Bashan Y, Bashan LE. 2005. Bacteria – Plant growthpromoting. In: HILLEL, D. *Encyclopedia of soils in the environment*. Oxford: Elsevier, 1:103-115.
- Baysal O, Soyulu EM, Soyulu S. 2003. Induction of defence-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. *Plant Pathology*, 52:747-753.
- Borsatti FC, Mazaro SM, Danner MA, Nava GA, Dalacosta NL. 2015. Indução de resistência e qualidade pós-colheita de amora-preta tratada com ácido salicílico¹. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 37:318-326.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248-254.
- Busso C, Mazaro SM. 2015. Utilization of colloidal chitin stained with remazol brilliant blue RSA a sensitive, rapid and economical alternative to detect chitinase in plants. In: 23rd Congress of the International Union for Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB), 2015, Foz do Iguaçu. Abstracts Book, 1:239 p.
- Campbell MK, Farrell SO. 2007. *Bioquímica*. 286 p.
- Carvalho NL. 2012. Resistência genética induzida em plantas cultivadas. *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental*, 7:1379-1390.
- Cavalcanti FR, Resende MLV, Zaccaroni AB, Ribeiro Junior PM, Costa JCB, Souza RM. 2006. Acibenzolar-S-metil e Ecolife® na indução de respostas de defesa do tomateiro contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*). *Fitopatologia Brasileira* 31:372-380.
- Choudhary DK, Prakash A, Johri BN. 2007. Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. *Indian Journal of Microbiology*, 47:289-297.
- Chowdappa, P.; Kumar, M.; Iashmi, 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*, 65:109-117.
- Durrant WE, Dong X. 2004. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 42, 185-209.
- Eghdami A, Sadeghi F. 2010. Determination of total phenolic and flavonoids contents in methanolic and aqueous extract of *Achillea millefolium*. *Organic Chemistry Journal*, 2:81-84.
- Gerasimova NG, Pridvorov SM, Ozeretskovskaya OL. 2005. Role of L-phenylalanine ammonia-lyase in the induced resistance and susceptibility of potato plants. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 41:103-105.
- Grover M, Madhubala R, Ali SKZ, Yadav SK, Venkateswarlu B. 2014. Influence of *Bacillus* spp. strains on seedling growth and physiological parameters of sorghum under moisture stress conditions. *Journal of Basic Microbiology*, 54:951-961.
- Heil M, Baldwin IT. 2002. Fitness costs of induced resistance: emerging experimental support for a slippery concept. *Trends in Plant Science*, 7:61-67.

- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13:572-284.
- Kang SM, Ramalingam R, You YH, Joo GJ, Lee IJ, Lee KE, Kim JH. 2014. Phosphate Solubilizing *Bacillus megaterium* mj1212 Regulates Endogenous Plant Carbohydrates and Amino Acids Contentsto Promote Mustard Plant Growth. *Indian Journal Microbiology*, 54:427-433.
- Klopper JW, Lifshitz R, Zablutowicz RM. 1989. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnology* 1:39-44.
- Kuhn OJ. 2007. Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção. Piracicaba (SP): Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. 138 p.
- Lanna RF, Ferro R, Pinho RSC. 2010. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. *Revista Trópica*, 4:12.
- Lawrence CB, Singh NP, Qiu J, Gardner RG, Tuzun S. 2000. Constitutive hydrolytic enzymes are associated with polygenic resistance of tomato to *Alternaria solani* and may function as an elicitor release mechanism. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 57:211-220.
- Lucas PW, Beta T, Darwell BW, Dominy NJ, Essackjee HC, Lee PKD, Osorio D, Ramsden L, Yamashita N, Yuen TDB. 2000. Field Kit to Characterize Physical, Chemical and Spatial Aspects of Potential Primate Foods. *Folia Primatol*, 72:11-25.
- Luz JMQ, Shinzato AV, Silva MAD. 2007. Comparação dos sistemas de produção de tomate convencional e orgânico em cultivo protegido. *Bioscience Journal*, 23:7-15.
- Majdah MY, Tuwajri A. 2009. Role of the biocontrol agents, *Trichoderma viride* and *Bacillus subtilis*, in elimination of the deteriorative effects of the root-rot pathogens, *Fusarium oxysporum* and *F. solani*, on some metabolic and enzyme activities of cucumber plants. *Egyptian Journal of Experimental Biology*, 5:29-35.
- Maldonado IR, Carvalho PGB, Ferreira NA. 2013. Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método DNS. Distrito Federal: Embrapa Hortaliças (Comunicado Técnico 85).
- Mazaro SM, Wagner AJ, Santos I, Citadin I, Possenti JC, Gouvêa A. 2009. Controle do tombamento de plântulas de beterraba e tomate pelo tratamento de sementes com quitosana. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 44:1424-1430.
- Moing A. 2000. Sugar alcohols as carbohydrate reserves in some higher plants. *Elservier Sciences* , 337-358.
- Olivares FL, Aguiar NO, Rosa RCC, Canellas LP. 2015. Substrate biofortification in combination with foliar sprays of plantgrowth promoting bacteria and humic substances boosts productionof organic tomatoes. *Scientia Horticulturae*, 183:100-108.
- Ownley B. H, Windham M T. 2010. Controle Biológico de Fitopatógenos. In: Trigiano, Robert N.; Windham, MARK T.; WINDHAM, ALAN S. Fitopatologia conceitos e exercícios de laboratório. Knoxville, Tennessee, 447-460.
- Pompelli MF, França SC, Tigre RC, Oliveira MT, Sacilot M, Pereira EC. 2012. Spectrophotometric determinations of chloroplastidic pigments in acetone, ethanol and dimethylsulphoxide. *Revista Brasileira de Biociencias*, 1152-1158.
- Price ML, Butler LG. 1977. Rapid Visual Estimation and Spectrophotometric Determination of Tannin Content of Sorghum Grain. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 25:1268-1273.
- Ramyabharathi SA, Meena B, Raguchander T. 2012. Induction of chitinase and β -1, 3-glucanase PR proteins in tomato through liquid formulated *Bacillus subtilis* EPCO 16 against *Fusarium* wilt. *Journal of Today's Biological Sciences*, 1:50-60.

- Randhir R, Lyn YT, Shetty K. 2004. Phenolics, their antioxidant and antimicrobial activity in dark germinated fenugreek sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 13: 295-307.
- Rosa CLS, Soares AG, Freitas DGC, Rocha MC, Ferreira JC, Godoy RLO. 2011. Caracterização físico-química, nutricional e Instrumental de quatro acessos de tomate Italiano (*Lycopersicum esculentum* mill) do tipo 'heirloom' produzido sob manejo orgânico para elaboração de polpa concentrada. *Alimentos e nutrição*, 22:649-656.
- SEAB, Secretaria da Agricultura e Abastecimento. Agroquímicos no Paraná. Disponível em <<http://celepar07web.pr.gov.br/agrotoxicos/pesquisar.asp>> Acesso em 26 de fevereiro de 2016.
- Shaharoon B, Naveed M, Arshad M, Zahir ZA. 2008. Fertilizer-dependente efficiency of pseudomonads for improving growth, yeld and nutrient efficiency of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79:147-155.
- Shirahige FH, Melo AMT, Purquerio LFV, Carvalho CLR, Melo PCT. 2010. Produtividade e qualidade de tomates Santa Cruz e Italiano em função do raleio de frutos. *Horticultura Brasileira*, 28: 292-298
- Silva FAZ, Azevedo CAV. 2002. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, 4:71-78.
- Smeeckens SJE. 2000. Sugar-induced signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51:49-81.
- Streit NM, Canterle LP, Canto MW, Heckteuer LH. 2005. As clorofilas. *Ciência Rural*, 35:748-755.
- Szilagyi-Zecchin, VJ, Mógor AF, Ruaro L, Röder C. 2015. Crescimento de mudas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) estimulado pela bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42 em cultura orgânica. *Revista de Ciências Agrárias*, 38:26-33.
- Walia A, Metha P, Chauhan A, Shirkot CK. 2014. Effect of *Bacillus subtilis* Strain CKT1 as Inoculum on Growth of Tomato Seedlings Under Net House Conditions. *Biological Sciences*, 84:145-155.
- Wirth SJ, Wolf GA. 1992. Micro-plate colourimetric assay for endo-acting cellulose, xylanase, chitinase, 1,3- β -glucanase and amylase extracted from forest soil horizons. *Soil Biology and Biochemistry*, 24:511-519.
- Wu CT, Bradford KJ. 2003. Class I chitinase and beta-1,3-glucanase are differentially regulated by wounding, methyl jasmonate, ethylene, and gibberellin in tomato seeds and leaves. *Plant Physiology*, 133:263-273.
- Yoshida K, Ueda S, Maeda I. 2009. Carotenoid production in *Bacillus subtilis* achieved by metabolic engineering. *Biotechnoly Letters*, 31:1789-1793.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos nesta pesquisa pode-se concluir que a bactéria *Bacillus subtilis*, produto comercial Serenade[®], proporcionou estímulo ao desenvolvimento de plantas de tomate durante seu crescimento inicial, principalmente se aplicado na forma de rega.

A aplicação da bactéria *Bacillus subtilis* não influenciou a produção das cultivar 'Cardyna' e 'Trinidade' em safras sucessivas, entretanto estimulou a produção de pigmentos relacionados com a fotossíntese, clorofila *a*, *b*, total e carotenoides, apresentou interações com os genótipos quanto ao acúmulo de açúcares redutores e não redutores e proporcionou o incremento das enzimas fenilalanina amônia-liase, quitinase e β -1,3-glucanases, relacionadas à defesa das plantas, mesmo as plantas não apresentando sintomas de doenças.

Em relação às vias de aplicação, os resultados demonstraram interação variando de acordo com a cultivar e a variável analisada.

A bactéria *Bacillus subtilis* favoreceu o desenvolvimento inicial de plantas de tomate, e mesmo alterando variáveis bioquímicas relacionadas a duas rotas de defesa das plantas não ocorreu perda metabólica e com isso não houve influência na produção.

Novos estudos, devem considerar a presença de patógenos haja visto que ocorreu ativação de rotas de defesa vegetal, e em condições de alta pressão do inóculo poderá resultar em redução de doenças e conseguinte alterar a produtividade.

ANEXOS

Anexo 1. Quadro da análise de variância de massa fresca das folhas, tomateiro das cultivares Cardyna e Trindade submetidas aos métodos de aplicação de inoculação de sementes, rega das mudas e testemunha sem aplicação aos 60 DAS.

FV	GL	SQ	QM	F
Métodos de aplicação	2	916,12000	458,06000	6,4531 **
Cultivares	1	1231,23375	1231,23375	17,3454 **
Interação	2	167,52000	83,76000	1,1800 ns
Resíduos	18	1277,70250	70,98347	
Total	23	3592,5765		
CV %	14,10			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade

* significativo ao nível de 5 % de probabilidade

ns não significativo

Anexo 2. Quadro da análise de variância de massa fresca de caules, de tomateiro das cultivares Cardyna e Trindade submetidas aos métodos de aplicação de inoculação de sementes, rega das mudas e testemunha sem aplicação aos 60 DAS.

FV	GL	SQ	QM	F
Métodos de aplicação	2	1741,02083	870,51042	11,0819 **
Cultivares	1	1735,70042	1735,70042	22,0960 **
Interação	2	70,98083	35,49042	0,4518 ns
Resíduos	18	1413,94750	78,55264	
Total	23	4961,64958		
CV %	16,44			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade

* significativo ao nível de 5 % de probabilidade

ns não significativo

Anexo 3. Quadro da análise de variância de massa fresca de raízes, de tomateiro das cultivares Cardyna e Trindade submetidas aos métodos de aplicação de inoculação de sementes, rega das mudas e testemunha sem aplicação aos 60 DAS.

FV	GL	SQ	QM	F
Métodos de aplicação	2	82,68510	41,34255	5,2535 *
Cultivares	1	116,68860	116,68860	14,8280 **
Interação	2	9,66630	4,83315	0,6142 ns
Resíduos	18	141,65100	7,86950	
Total	23	350,69100		
CV %	17,69			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade

* significativo ao nível de 5 % de probabilidade

ns não significativo

Anexo 4. Quadro da análise de variância de massa seca de folhas, de tomateiro das cultivares Cardyna e Trindade submetidas aos métodos de aplicação de inoculação de sementes, rega das mudas e testemunha sem aplicação aos 60 DAS.

FV	GL	SQ	QM	F
Métodos de aplicação	2	2,75956	1,37978	54,8590 **
Cultivares	1	8,96704	8,96704	356,5226 **
Interação	2	0,10577	0,05289	2,1028 ns
Resíduos	18	0,45272	0,02515	
Total	23	12,28510		
CV %	2,71			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade

* significativo ao nível de 5 % de probabilidade

ns não significativo

Anexo 5. Quadro da análise de variância de massa seca de caules, de tomateiro das cultivares Cardyna e Trindade submetidas aos métodos de aplicação de inoculação de sementes, rega das mudas e testemunha sem aplicação aos 60 DAS.

FV	GL	SQ	QM	F
Métodos de aplicação	2	12,69331	6,34665	410,3440 **
Cultivares	1	4,95042	4,95042	320,0700 **
Interação	2	1,12706	0,56353	36,4351 **
Resíduos	18	0,27840	0,01547	
Total	23	19,04918		
CV %	2,72			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade

* significativo ao nível de 5 % de probabilidade

ns não significativo

Anexo 6. Quadro da análise de variância de massa seca de raízes, de tomateiro das cultivares Cardyna e Trindade submetidas aos métodos de aplicação de inoculação de sementes, rega das mudas e testemunha sem aplicação aos 60 DAS.

FV	GL	SQ	QM	F
Métodos de aplicação	2	0,16356	0,08178	23,3655 **
Cultivares	1	0,25627	0,25627	73,2190 **
Interação	2	0,03636	0,01818	5,1940 *
Resíduos	18	0,06300	0,00350	
Total	23	0,51918		
CV %	5,85			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade

* significativo ao nível de 5 % de probabilidade

ns não significativo

Anexo 7. Quadro de análise de variância de parte aérea (cm²) de tomateiro das cultivares Cardyna e Trindade submetidas aos métodos de aplicação de inoculação de sementes, rega das mudas e testemunha sem aplicação aos 60 DAS.

FV	GL	SQ	QM	F
Métodos de aplicação	2	9398457,52	4699228,76	33,8516 **
Cultivares	1	2225962,04	2225962,04	16,0351 **
Interação	2	3100219,70	1550109,85	11,1665 **
Resíduos	18	2498730,27	138818,34	
Total	23	17223369,54		
CV %	12,51			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade

* significativo ao nível de 5 % de probabilidade

ns não significativo

Anexo 8. Quadro da análise de variância de e açúcares totais em µg por grama de material vegetal, de folhas de tomate tipo italiano das cultivares Cardyna e Trindade.

FV	GL	SQ	QM	F
Formas de aplicação	3	2575522,67785	858507,55928	1,9223 ns
Cultivares	1	918714,48771	918714,48771	2,0571 ns
Interação	3	2198851,05267	732950,35089	1,6411 ns
Resíduos	16	7145671,29482	446610,08093	
Total	23	12838849,51305		
CV %	9,34			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade

* significativo ao nível de 5 % de probabilidade

ns não significativo

Anexo 9. Quadro da análise de variância de e açúcares redutores em μg por grama de material vegetal, de folhas de tomate tipo italiano das cultivares Cardyna e Trindade.

FV	GL	SQ	QM	F
Formas de aplicação	3	6093267,41	2031089,13	8,6384 **
Cultivares	1	921,27	921,27	0,0039 ns
Interação	3	7901569,74	2633856,58	11,2020 **
Resíduos	16	3761991,65	235124,47	
Total	23	17757750,07		
CV %	9,03			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade

* significativo ao nível de 5 % de probabilidade

ns não significativo

Anexo 10. Quadro da análise de variância de e açúcares não redutores em μg por grama de material vegetal, de folhas de tomate tipo italiano das cultivares Cardyna e Trindade.

FV	GL	SQ	QM	F
Formas de aplicação	3	2352002,02417	784000,67472	15,0287 **
Cultivares	1	210814,68663	210814,68663	4,0412 ns
Interação	3	2346475,65729	782158,55243	14,9934 **
Resíduos	16	834648,02982	52166,75186	
Total	23	5743960,39791		
CV %	12,57			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade

* significativo ao nível de 5 % de probabilidade

ns não significativo

Anexo 11. Quadro da análise de variância de compostos fenólicos em mg por grama de material vegetal, de folhas de tomate tipo italiano das cultivares Cardyna e Trindade.

FV	GL	SQ	QM	F
Formas de aplicação	3	491760,82496	163920,27499	2,9343 ns
Cultivares	1	112731,02839	112731,02839	2,0180 ns
Interação	3	162692,04030	54230,68010	0,9708 ns
Resíduos	16	893818,64845	55863,66553	
Total	23	1661002,54210		
CV %	5,82			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade

* significativo ao nível de 5 % de probabilidade

ns não significativo

Anexo 12. Quadro da análise de variância de flavonoides em mg por grama de material vegetal, de folhas de tomate tipo italiano das cultivares Cardyna e Trindade.

FV	GL	SQ	QM	F
Formas de aplicação	3	18408,23668	6136,07889	0,2087 ns
Cultivares	1	23,06528	23,06528	0,0008 *
Interação	3	65535,90312	21845,30104	0,7429 ns
Resíduos	16	470495,50358	29405,96897	
Total	23	554462,70865		
CV %	9,15			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade

* significativo ao nível de 5 % de probabilidade

ns não significativo

Anexo 13. Quadro da análise de variância de proteínas em mg por grama de material vegetal, de folhas de tomate tipo italiano das cultivares Cardyna e Trinidad.

FV	GL	SQ	QM	F
Formas de aplicação	3	1,20641	0,40214	11,4531 **
Cultivares	1	0,46470	0,46470	13,2350 **
Interação	3	0,22035	0,07345	2,0919 ns
Resíduos	24	0,84268	0,03511	
Total	31	2,73415		
CV %	11,82			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade

* significativo ao nível de 5 % de probabilidade

ns não significativo

Anexo 14. Quadro de análise de variância de fenilalanina amônia-liase (FAL) em UAbs/min/mg proteína de folhas de tomate tipo italiano das cultivares 'Cardyna' e 'Trinidad'.

FV	GL	SQ	QM	F
Formas de aplicação	3	0,00122	0,00041	10,8093 **
Cultivares	1	0,00031	0,00031	8,3303 **
Interação	3	0,00148	0,00049	13,0723 **
Resíduos	24	0,00090	0,00004	
Total	31	0,00391		
CV %	11,43			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade

* significativo ao nível de 5 % de probabilidade

ns não significativo

Anexo 15. Quadro de análise de variância de quitinase em U.E/mg.proteína de folhas de tomate tipo italiano das cultivares Cardyna e Trinidad.

FV	GL	SQ	QM	F
Formas de aplicação	3	1,94196	0,64732	127,8447 **
Cultivares	1	1,09654	1,09654	216,5644 **
Interação	3	1,19511	0,39837	78,6773 **
Resíduos	24	0,12152	0,00506	
Total	31	4,35513		
CV %	6,21			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade

* significativo ao nível de 5 % de probabilidade

ns não significativo

Anexo 16. Quadro de análise de variância de glucanases em U.E/mg.proteína de folhas de tomate tipo italiano das cultivares Cardyna e Trinidad.

FV	GL	SQ	QM	F
Formas de aplicação	3	0,00008	0,00003	22,7000 **
Cultivares	1	0,00004	0,00004	28,4518 **
Interação	3	0,00003	0,00001	7,6790 **
Resíduos	24	0,00003	0,00000	
Total	31	0,00018		
CV %	8,97			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade

* significativo ao nível de 5 % de probabilidade

ns não significativo