

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

**POTENCIAL SUPRESSIVO À FUSARIOSE DE UM SOLO SOB DIFERENTES  
SISTEMAS DE MANEJO**

**Bruno Brito Lisboa  
(TESE)**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

**POTENCIAL SUPRESSIVO À FUSARIOSE DE UM SOLO SOB DIFERENTES  
SISTEMAS DE MANEJO**

BRUNO BRITO LISBOA

Engenheiro Agrônomo (UFRGS)  
Mestre em Ciência do Solo (UFRGS)

Tese apresentada como  
um dos requisitos à obtenção do  
Grau de Doutor em Ciência do Solo

Porto Alegre, (RS), Brasil  
Agosto de 2013

CIP - Catalogação na Publicação

LISBOA, BRUNO BRITO  
POTENCIAL SUPRESSIVO À FUSARIOSE DE UM SOLO SOB  
DIFERENTES SISTEMAS DE MANEJO / BRUNO BRITO LISBOA. -  
- 2013.  
96 f.

Orientador: FLÁVIO ANASTÁCIO DE OLIVEIRA CAMARGO.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de  
Pós-Graduação em Ciência do Solo, Porto Alegre, BR-RS,  
2013.

1. QUALIDADE DO SOLO. 2. CONTROLE BIOLÓGICO. 3.  
ATIVIDADE MICROBIANA. 4. RISA. 5. METAGENÔMICA. I.  
CAMARGO, FLÁVIO ANASTÁCIO DE OLIVEIRA, orient. II.  
Título.

BRUNO BRITO LISBOA  
Engenheiro Agrônomo - UFRGS  
Mestre em Ciência do Solo - UFRGS

## TESE

Submetida como parte dos requisitos  
para obtenção do Grau de

### DOUTOR EM CIÊNCIA DO SOLO

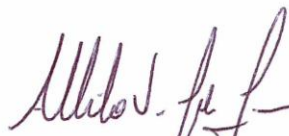
Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo  
Faculdade de Agronomia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 29.08.2013  
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 09.12.2013  
Por



PEDRO ALBERTO SELBACH  
Presidente da Comissão Examinadora  
Departamento de Solos/UFRGS



ALBERTO V. TINDA JUNIOR  
Coordenador do Programa de  
Pós-Graduação em Ciência  
do Solo



ENILSON LUIZ SACCOL DE SÁ  
Departamento de Solos/UFRGS



LUCIANE MARIA PEREIRA PASSAGLIA  
Departamento de Genética/UFRGS



ANELISE BENEDEUZI DA SILVEIRA  
FEPAGRO



PEDRO ALBERTO SELBACH  
Diretor da Faculdade  
de Agronomia

Aos meus pais, Nelson e Lúcia, pelo permanente apoio.  
À minha esposa, companheira de todas as horas, Ane e ao nosso filho Guilherme.  
A vocês, DEDICO esse trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família pelo apoio e pela valorização de meu esforço.

Ao meu orientador prof. Flávio Camargo pelos conselhos e pela paciência durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Ao colega da FEPAGRO, Luciano Kayser Vargas pela realização do sequenciamento das amostras de DNA do solo juntamente com o grupo do Prof. Volker Wendisch da Universidade de Bielefeld (Alemanha) e, fundamentalmente, pelas constantes sugestões, troca de ideias e camaradagem.

Ao prof. Cimélio Bayer pela oportunidade de realizar a pesquisa a partir do experimento de manejo de solo da EEA.

Às colegas Adriana Ambrosini, Anelise Beneduzi e Camille Granada pelas ideias para qualificar o trabalho e também por todo auxílio nas técnicas relacionadas com biologia molecular, durante todo o desenvolvimento do projeto.

À colega da FEPAGRO Andréia Oliveira pelo constante auxílio nos temas relacionados à fitopatologia.

À colega da FEPAGRO, Adriana Martins por toda a ajuda na execução dos ensaios de laboratório.

Ao secretário do PPGCS, Jáder Amaro pela paciência e permanente disposição para ajudar.

Aos colegas, professores e funcionários do Departamento de Solos pelo auxílio e amizade.

A todos estagiários de iniciação científica que participaram nas diferentes fases do trabalho.

À Embrapa pela concessão da bolsa de estudos.

À Fepagro pela liberação para realização do curso de Doutorado.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos, meu muito obrigado!

# POTENCIAL SUPRESSIVO À FUSARIOSE DE UM SOLO SOB DIFERENTES SISTEMAS DE MANEJO

Autor: Bruno Brito Lisboa

Orientador: Prof. Flávio Anastácio de Oliveira Camargo

## RESUMO

O manejo, em termos de preparo e sistemas de culturas, exerce forte influência sobre propriedades biológicas do solo e essas, por sua vez, condicionam o potencial supressivo do solo a doenças de plantas. A supressão é descrita como a capacidade do solo em reduzir a incidência de doenças vegetais, causada por fitopatógenos habitantes do solo, mesmo em condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento destes. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência de diferentes sistemas de manejo do solo sobre o potencial supressivo à podridão da raiz do trigo, causada pelo fungo fitopatogênico *Fusarium graminearum* e a relação deste processo com parâmetros microbiológicos do solo. As avaliações foram realizadas a partir de amostras de um Argissolo vermelho distrófico, coletadas em um experimento de manejo de longa duração conduzido sob plantio direto e preparo convencional do solo e cultivado com os sistemas de culturas aveia+vica/milho+caupi, vica/milho e aveia/milho. As avaliações do potencial supressivo do solo em ensaios *in vitro* e *in vivo* demonstraram que as amostras provenientes das parcelas manejadas em plantio direto foram mais supressivas à incidência podridão do trigo e ao desenvolvimento de *F. graminearum*. Também foi observada a redução da incidência da doença e do patógeno nas amostras de solo cultivadas sob o sistema aveia+vica/milho+caupi enquanto o sistema aveia/milho foi o menos supressivo. Foram identificadas correlações positivas entre a supressividade do solo e os diferentes parâmetros microbiológicos avaliados, o que demonstra o importante papel da microbiota do solo na geração do processo de supressividade do solo. De maneira geral, os sistemas de manejo que contribuíram para o incremento da matéria orgânica estimularam a microbiota do solo em termos de atividade, biomassa e diversidade, e por consequência, favoreceram a supressão do solo à podridão do trigo causada por *F. graminearum*.

---

<sup>1/</sup> Tese de Doutorado em Ciência do Solo. Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. (81p.) Agosto, 2013.



# EVALUATION OF THE SUPPRESSIVE POTENTIAL AGAINST FUSARIOSIS OF A SOIL UNDER DIFERENT MANAGEMENT SYSTEMS<sup>1/</sup>

Author: Bruno Brito Lisboa

Adviser: Prof. Flávio Anastácio de Oliveira Camargo

## ABSTRACT

Soil management, taking into account tillage and crop systems, strongly influences soil biological properties and these, in their turn, regulate the suppressive potential of the soil against plant diseases. Soil suppressiveness is described as the soil ability in reducing the incidence of plant diseases caused by soil-borne pathogens, even when environmental conditions favor the pathogens development. The present research aimed to evaluate the influence of different soil management systems over the suppressive potential of a soil against the wheat root rot, caused by *Fusarium graminearum*, and the relationship of this process with soil microbial parameters. The evaluations were performed using soil samples taken from a long-term experiment, conducted in a Paleudult soil, under conventional or no-tillage systems with three crop systems: vetch+oat/maize+cowpea, vetch/maize and oat/maize. The *in vitro* and *in vivo* evaluations of the soil suppressive potential demonstrated that the samples from plots under no-tillage were more suppressive to wheat root rot and to the development of *F. graminearum*. It was also observed the decrease in the disease incidence in samples from vetch+oat/maize+cowpea crop system, while oat/corn was the less suppressive system. We identified positive correlations between soil suppressiveness and different microbial parameters, which demonstrates the important role of soil microbes in the generation of soil suppressiveness process. In general, the management systems that contributed to the increase of soil organic matter stimulated soil microbial activity, biomass and diversity, and, therefore, favored the suppression of wheat root rot caused by *F. graminearum*.

---

<sup>1/</sup>Doctoral thesis in Soil Science - Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.(81p.) August, 2012.

## SUMÁRIO

	Página
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	03
2.1 Supressividade do solo a fitopatógenos.....	03
2.2 Impacto do manejo do solo sobre a supressividade.....	07
2.3 Mecanismos de ação.....	12
2.3.1 Produção de sideróforos.....	12
2.3.2 Produção de compostos antimicrobianos.....	13
2.3.2.1 Compostos não voláteis.....	13
2.3.2.2 Compostos voláteis.....	14
2.4 Indicadores bioquímicos de supressividade.....	15
2.4.1 Atividade e biomassa microbiana do solo.....	16
2.4.2 Atividade enzimática do solo.....	17
2.4.3 Diversidade genética.....	18
<b>3. HIPÓTESES</b> .....	20
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	21
4.1 Tratamentos e amostragens.....	21
4.2 Bioensaios de supressividade.....	23
4.2.1 Bioensaio <i>in vivo</i> .....	23
4.2.2 Bioensaio <i>in vitro</i> .....	24
4.3 Indicadores bioquímicos.....	25
4.3.1 Atividade respiratória da microbiota do solo.....	25
4.3.2 Biomassa da microbiota do solo.....	26
4.3.3 Atividade da enzima quitinase.....	27
4.4 Análises de diversidade genética.....	28
4.4.1 Extração de DNA metagenômico da comunidade microbiana do Solo.....	28
4.4.2 Análise do espaço intergênico ribossomal (RISA).....	28
4.4.3 Sequenciamento de última geração (NGS) do gene 16S rDNA...	29
4.4.4 Extração do DNA genômico dos isolados bacterianos.....	33
4.4.5 Amplificação e sequenciamento do gene 16S rDNA de isolados bacterianos .....	33
4.5 Mecanismos de ação.....	34
4.5.1 Isolamento de bactérias do solo.....	34
4.5.2. Testes de antibiose.....	35

4.5.3 Antibiose por compostos voláteis.....	35
4.5.4 Teste de produção de sideróforos.....	36
4.6 Análises estatísticas.....	36
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>37</b>
5.1 Ensaio de supressividade.....	37
5.2 Indicadores bioquímicos.....	41
5.2.1 Atividade e biomassa microbiana.....	42
5.2.2 Atividade da enzima quitinase.....	46
5.2.3 Matéria orgânica do solo.....	48
5.3 Diversidade genética.....	49
5.3.1 Análise do espaço intergênico ribossomal (RISA).....	49
5.3.2 Sequenciamento de última geração (NGS) do gene 16S rDNA...	50
5.4 Mecanismos de ação.....	59
5.4.1 Isolamento e sequenciamento de bactérias.....	59
5.4.2 Testes de antibiose.....	60
5.4.3 Produção de sideróforos.....	63
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>66</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>67</b>
<b>8. APÊNDICES.....</b>	<b>80</b>

## RELAÇÃO DE TABELAS

Página

<b>01.</b> Análise química do solo nos diferentes sistemas de preparo de solo e culturas. (PD = Plantio direto, PC = Preparo convencional, A+V/M+C = aveia +vica / milho + caupi, V/M = vica/ milho e A/M = aveia + milho).....	23
<b>02.</b> Índices dos adaptadores Illumina, composição da sequência e tratamento identificado por cada índice. Índice Sequência Tratamento correspondente solo (Sistemas: A+V/M+C = aveia+vica/milho+caupi, V/M = vica/milho e A/M = aveia/milho, PD = plantio direto, PC = preparo convencional).....	31
<b>03.</b> Índices de diversidade alfa em um Argissolo submetido a diferentes sistemas de manejo de solo.....	56
<b>04.</b> Avaliação de potenciais mecanismos de ação de inibição de <i>F. graminearum</i> de isolados bacterianos oriundos de solo sobre diferentes sistemas de manejo de solo.....	61

## RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Croqui do experimento, destacando a disposição dos blocos e as parcelas principais relativas ao sistema de preparo de solo e as subparcelas indicando os sistemas de culturas (PD = Plantio direto, PC = Preparo convencional, A+V/M+C = aveia + vica / milho + caupi, V/M = vica/ milho e A/M = aveia/milho).....	22
2. A) Imagem da colônia de <i>Fusarium graminearum</i> , e os vasos com diferentes níveis de severidade da podridão comum do trigo: (B) sem sintomas; (C) leve bronzeamento do colo; (D) moderado bronzeamento do colo; (E) severo bronzeamento do colo e (F) planta morta.....	37
3. Imagem do teste <i>in vitro</i> de supressividade do patógeno <i>F. graminearum</i> : placa com ausência de crescimento micelial do patógeno (A) e placa com solo tratado com solo fumigado com clorofórmio, tomada pelo micélio (B).....	38
4. Supressividade <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> em diferentes sistemas de preparo de solo. Valores seguidos por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% (PD= plantio direto e PC= preparo convencional).....	39
5. Supressividade <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> em diferentes sistemas de culturas. Valores seguidos por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% (Rotações: A+V/M+C = aveia+viça/milho+caupi, V/M = vica/milho e A/M = aveia/milho).....	40
6. Biomassa e atividade microbiana em diferentes sistemas de preparo do solo. Valores seguidos por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% (PD= plantio direto e PC= preparo convencional).....	42
7. Biomassa e atividade microbiana em diferentes sistemas de culturas. Valores seguidos por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% (Rotações: A+V/M+C = aveia+viça/milho+caupi, V/M = vica/milho e A/M = aveia/milho).....	43
8. Correlação entre supressividade <i>in vivo</i> , biomassa e atividade microbiana do solo.....	44
9. Correlação entre supressividade <i>in vitro</i> , biomassa e atividade microbiana do solo.....	45
10. Atividade da enzima quitinase em diferentes sistemas de preparo de solo. Valores seguidos por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% (PD= plantio direto e PC= preparo convencional).....	46

<b>11.</b> Atividade da enzima quitinase em diferentes sistemas de culturas. Valores seguidos por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% (Rotações: A+V/M+C = aveia+viça/milho+caupi, V/M = vica/milho e A/M = aveia/milho).....	47
<b>12.</b> Correlação entre matéria orgânica do solo (0-7 cm) e supressividade <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	48
<b>13.</b> Similaridade entre os perfis bacterianos da comunidade microbiana de solo submetido a diferentes sistemas de manejo (agrupamento gerado pelo coeficiente de Jacard).....	50
<b>14.</b> <i>Heat map</i> , produzido a partir do ponto de corte de 1.000 OTUs no conjunto de dados, apresentando o número de cada OTU por amostra.....	51
<b>15.</b> Número de unidades taxonômicas operacionais (OTUs) identificadas por sequenciamento de última geração, em amostras de um Argissolo submetido a diferentes sistemas de preparo de solo. Valores seguidos por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Scott-knott, ao nível de 5% (Sistemas: PC = preparo convencional e PD = plantio direto).....	52
<b>16.</b> Número de unidades taxonômicas operacionais (OTUs) identificadas por sequenciamento de última geração, em amostras de um Argissolo submetido a diferentes sistemas de culturas. Valores seguidos por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Scott-knott, ao nível de 5% (Sistemas: A+V/M+C = aveia+vica/milho+caupi, V/M = vica/milho e A/M = aveia/milho).....	53
<b>17.</b> Proporção relativa de filios bacterianos em amostras de um Argissolo submetido a diferentes sistemas de preparo de solo (Sistemas: PC = preparo convencional e PD = plantio direto).....	54
<b>18.</b> Proporção relativa de filios bacterianos em amostras de um Argissolo submetido a diferentes sistemas culturas (Sistemas: A+V/M+C = aveia+vica/milho+caupi, V/M = vica/milho e A/M = aveia/milho).....	55
<b>19.</b> Análise de componentes principais da comunidade bacteriana de um argissolo submetido a diferentes sistemas de manejo de solo. (Sistemas: A+V/M+C = aveia+viça/milho+caupi, V/M = vica/milho e A/M = aveia/milho).....	57
<b>20.</b> Análise de agrupamento da comunidade bacteriana de um Argissolo submetido a diferentes sistemas de manejo de solo nos blocos (Sistemas: A+V/M+C = aveia+vica/milho+caupi, V/M = vica/milho e A/M = aveia/milho).....	59

**21.** Mecanismos de ação dos isolados antagonistas: (A) Redução do crescimento micelial de *F. graminearum* em função da produção de compostos voláteis em relação à testemunha..... 62

**22.** Mecanismos de ação dos isolados antagonistas: geração de halo em meio KB com cromo-azurol, indicando a produção de sideróforos..... 64

## RELAÇÃO DE APÊNDICES

	Página
1. Meio de cultura SNA .....	81
2. Tampão universal modificado (MUB), pH 6.....	81
3. Solução de p-nitrofenol-β-D-glucosidase 0,05M (NAG).....	81
4. Solução Padrão de p-nitrofenol.....	82
5. Meio de cultura para isolamento de bactérias do solo (Meio Thornton).....	82
6. Meio Levedura maitol (LM).....	82
7. Meio King-B.....	82
8. Meio CAS.....	83



## 1. INTRODUÇÃO

A manutenção ou mesmo a melhoria da qualidade original do solo, visando à produção vegetal e à preservação ambiental, é um fator fundamental para a sustentabilidade dos agroecossistemas. Assim, o manejo adequado dos solos agrícolas é parte essencial para o alcance desses objetivos, uma vez que os sistemas de preparo e os sistemas de culturas interferem de modo significativo nas propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, as quais compõem o tripé sobre o qual se assenta a qualidade do solo.

A adoção de manejos conservacionistas do solo, como o plantio direto e a rotação de culturas, ao invés do preparo convencional e ao monocultivo, tem como principal efeito o incremento do conteúdo de carbono orgânico no sistema, o que por sua vez impacta fortemente a microbiota do solo. A conseqüente elevação da diversidade, da atividade e da biomassa microbiana do solo repercute diretamente no desenvolvimento das culturas sobre vários aspectos, inclusive em termos de sanidade vegetal.

As principais espécies cultivadas são alvo de doenças causadas por fitopatógenos habitantes do solo, tendo como principal conseqüência a redução da produtividade. Estas moléstias são de difícil controle pelo emprego de produtos químicos ou por meio de resistência varietal obtida via melhoramento vegetal convencional. As podridões radiculares são o principal exemplo dessas moléstias, sendo o gênero *Fusarium* um dos mais representativos dentre os agentes causais, podendo infectar uma ampla gama de hospedeiros.

O fenômeno conhecido como supressividade do solo a fitopatógenos pode ser considerado como uma propriedade emergente do solo, o qual atua em maior ou menor intensidade em todos os solos, sendo gerado principalmente pela atividade microbiana autóctone, que por sua vez, em agroecossistemas, é fortemente influenciada pelo manejo do solo.

A avaliação dos impactos de práticas de manejo sobre o potencial supressivo do solo pode ser realizada por meio de bioensaios. Além disso, atualmente, uma série de diferentes parâmetros bioquímicos pode ser utilizada na pesquisa como ferramenta para avaliar a qualidade do solo, as quais podem também ser empregadas para monitorar e prever a capacidade supressiva do solo frente a distúrbios gerados pelo manejo do solo.

Neste contexto, o presente trabalho avaliou a capacidade supressiva de um solo, submetido a diferentes sistemas de manejo, à podridão comum do trigo (*Triticum aestivum*) e ao fitopatógeno causador da doença (*Fusarium graminearum*), relacionando-a com indicadores bioquímicos de qualidade do solo, além de identificar prováveis mecanismos microbiológicos pelos quais o processo ocorre.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Supressividade do Solo a Fitopatógenos

Doenças vegetais causadas por fitopatógenos oriundos do solo causam importantes danos às culturas, principalmente no sistema radicular de plântulas e plantas adultas. Muitas destas doenças são de difícil controle por meio de produtos químicos e cultivares resistentes (Weller et al., 2002).

Nesse contexto, a sanidade vegetal é um importante componente da qualidade do solo, na qual os fitopatógenos interagem com a comunidade microbiana na interface solo/planta (Peters et al., 2003). Dessa complexa relação, emerge a propriedade conhecida como “poder supressivo do solo”. Esse fenômeno foi inicialmente observado na década de 30, nos EUA, onde o trigo cultivado em determinadas áreas apresentava menor incidência de doenças radiculares causadas por *Fusarium* (Klopper et al., 1980). A conceituação do processo, que ainda hoje é empregada, foi estabelecida na década de 70 por Baker e Cook (1974). Esses autores definiram a supressividade do solo a doenças como “a capacidade do solo em manter baixa a incidência ou severidade de determinada moléstia, mesmo com a presença do patógeno, plantas suscetíveis e condições ambientais favoráveis ao seu desenvolvimento”. A partir dessa lógica, entende-se que a supressividade do solo pode manifestar-se das seguintes formas:

- I- O patógeno não se estabelece;
- II- O patógeno estabelece-se, mas causa pequeno ou nenhum dano;

III- Há o estabelecimento e a geração da doença, mas com pouca importância, com a sobrevivência do propágulo do fitopatógeno no solo.

Importantes doenças vegetais causadas por bactérias, fungos e nematóides são influenciadas pelo efeito supressivo do solo (Weller et al., 2002), como o caso das podridões radiculares causadas pelo gênero *Fusarium* em diversas culturas (Kinkel et al., 2011). Conceitualmente, duas formas de supressão de doenças no solo podem ser diferenciadas: específica e geral (Baker e Cook 1974). A supressão específica é promovida por um ou poucos genótipos de microrganismos que empregam um determinado mecanismo de ação para efetuar o controle, como verificado em isolados de bactérias do gênero *Pseudomonas* produtoras do antimicrobiano fluoroglucinol capaz de suprimir o agente causal da podridão negra das raízes do trigo, *Gaeumannomyces graminis* (Raaijmakers e Weller 1998). A ocorrência da supressão do tipo específica, mediada por determinados antagonistas, pode ser gerada em qualquer região do solo, contudo, ocorre predominantemente no solo rizosférico, zona onde a atividade microbiana é mais intensa em função da liberação de exudatos radiculares (Lambers et al., 2009). Outra importante particularidade deste tipo de supressão é a capacidade de seu efeito ser transferido para um solo não supressivo, isto é, uma pequena quantidade do solo supressivo pode ser utilizada como inóculo em um não supressivo, fazendo com que um determinado grupo microbiano, responsável pela inibição de determinada doença, também seja transferido (Weller et al., 2002).

Já a supressão geral de doenças é promovida por múltiplos microrganismos do solo, os quais, por meio de diferentes mecanismos de ação, podem inibir uma gama de patógenos. O fato de a supressividade do tipo geral não depender de apenas um grupo específico de microrganismos, faz com que, em caso da ocorrência de distúrbios no solo, esta seja rapidamente restabelecida, isto é, o processo apresenta forte resiliência em virtude da

redundância das funções exercidas pelos componentes da comunidade microbiana do solo (Weller, et al., 2002). A origem da supressão geral é diretamente relacionada com a atividade microbiana global do solo, e, portanto, é fortemente influenciada pela disponibilidade de nutrientes e manejo do solo (Hoitink e Boehm 1999; Weller et al. 2002, Hadar e Papadopoulou, 2012). A supressão geral se caracteriza por ocorrer principalmente em solo não rizosférico, e é especialmente efetiva contra patógenos que possuam uma fase saprofítica, ou seja, aqueles que não necessitam obrigatoriamente estar parasitando tecido vegetal vivo. Dessa forma, é esperado que todo solo possua intrinsecamente um potencial de inibição de doenças, gerado pela microbiota autóctone, quando comparado com sua condição estéril (Baker e Cook, 1974). As duas formas de supressão, geral e específica, podem atuar de forma simultânea (Weller, 2002).

O papel da atividade microbiana do solo na geração do processo supressivo foi evidenciado por Termorshuizen et al. (2006) em estudo que analisou o efeito da aplicação de diferentes compostos orgânicos no potencial supressivo do solo, no qual foi identificada a supressão de doenças em 97% das avaliações. Segundo os autores, o efeito positivo dos compostos na supressão de doenças foi decorrente da estimulação da microbiota global do solo, o que aumentou, dessa forma, a supressão geral.

Ainda no âmbito do conceito de supressividade geral, existe um importante componente conhecido como “fungistase”, definido como a redução da germinação de esporos e do crescimento do micélio de fungos. Este fenômeno foi primeiramente descrito por Dobbs e Hinson (1953), os quais demonstraram a capacidade de muitos solos de controlar doenças provocadas por fungos fitopatogênicos. Desde então, pesquisas tem sido realizadas no sentido de avaliar parâmetros relacionados com características físicas e químicas do solo, composição da comunidade microbiana do solo e alterações

ambientais para determinar os mecanismos pelos quais a fungistase ocorre (Mondal e Hyakumachi, 1998; Alabouvette, 1999; Mazzola, 2004).

A fungistase é resultante de um ambiente de grande competição por nutrientes e nichos. A baixa disponibilidade de fontes de carbono no solo pode reduzir a germinação de esporos de fungos fitopatogênicos por meio de sinalização bioquímica (Garbeva et al. 2011). Além disso, a presença de metabólitos com propriedades antagonistas, produzidos pela microbiota do solo, também é importante para a geração do fenômeno. Estes compostos são antibióticos, sideróforos e enzimas extracelulares bem como outras substâncias que podem aumentar o potencial supressivo (Adesina et al., 2007; Perneel et al., 2008; Meyer et al., 2010).

A fungistase em determinadas situações pode ser interpretada como ecologicamente vantajosa para os fungos fitopatogênicos, pois a inibição da germinação de seus esporos, na ausência de nutrientes no ambiente, evita que os patógenos desenvolvam-se numa condição desfavorável, mantendo assim, a viabilidade de seus propágulos para uma situação mais adequada para iniciar a infecção do hospedeiro (Garbeva et al., 2011).

No presente, os estudos sobre a supressão do solo estão focados principalmente sobre grupos bacterianos específicos, especialmente *Pseudomonas* e seus metabólitos com propriedades antibióticas (Raaijmakers et al., 1997; Raaijmakers and Weller, 1998; Siddiqui et al., 2002;; Meyer et al., 2010), ou seja, concentrados na supressão específica. Entretanto, microrganismos do solo que aparentemente não possuem propriedades antagonistas também podem exibir um intenso efeito negativo sobre o crescimento *in vitro* de fungos patogênicos (De Boer, 2007). A inibição do desenvolvimento de fitopatógenos pode ser promovida pela ação indireta de microrganismos que não possuem a capacidade de produzir antimicrobianos, mas que podem potencializar a produção de metabólitos antibióticos por outros microrganismos do solo (Lutz et al., 2004; Maurhofer et al., 2004).

A intensidade da ação supressiva do solo sobre os fitopatógenos depende da capacidade destes em utilizar fontes de carbono e sobreviver no solo desenvolvendo atividade saprofítica. Essas condições podem ser verificadas na prática no caso do tombamento de plântulas, causado por *Pythium* sp., o qual manifesta-se com baixa severidade em cultivos realizados em solos bem estruturados e bem aerados (Termorshuizen e Jeger, 2008). A intensa atividade microbiana do solo nessas condições torna baixa a capacidade de sobrevivência do patógeno. Todavia, em condições de excesso de umidade e na conseqüente redução da atividade microbiana do solo, a agressividade do patógeno é potencializada. Esse processo é influenciado também pelo cultivo presente na área, pois os vegetais utilizam como estratégia de defesa o estímulo seletivo de microrganismos antagonistas por meio de exsudados liberados na rizosfera (Hartmann, et al, 2009), sendo que estes podem corresponder a até 20% do total do carbono fotoassimilado (Marschner, 1995).

## **2.2 Impacto do Manejo do Solo Sobre a Supressividade**

O solo agrícola é um ecossistema complexo no qual o fluxo dos processos é alterado pelo manejo adotado, como, por exemplo, o tipo de preparo do solo e sistemas de culturas. O impacto gerado pelo manejo do solo pode conduzir o sistema para um processo de degradação, o qual pode afetar propriedades físicas (perdas de solo, compactação), químicas (lixiviação de nutrientes) e biológicas (aumento da incidência de doenças vegetais) (Jantalia et al., 2006). Ou, ao contrário, um manejo adequado pode levar a um processo de recuperação destas propriedades (Bayer e Mielniczuk, 1997).

Os sistemas de preparo de solo diferem, essencialmente, quanto ao grau de mobilização e à forma de disposição dos resíduos vegetais no solo. O preparo convencional (PC) tem como característica principal o revolvimento do solo por meio de operações de aração e gradagem, com a incorporação dos

resíduos vegetais. Esse sistema apresenta problemas como a perda da qualidade estrutural do solo, redução dos teores de matéria orgânica, erosão superficial e compactação abaixo da camada arável (Derpsch et al., 2010). O sistema plantio direto (PD) surgiu como uma alternativa para reduzir esses processos de degradação, mediante a eliminação das operações de revolvimento do solo e a manutenção permanente do solo coberto com restos culturais (Derpsch et al., 2010). A adoção dessa prática proporcionou a redução da erosão e o aumento dos teores de C orgânico do solo (Alvarez, 1995; Bayer e Mielniczuk, 1997; Wang et al., 2011). Contudo, alguns problemas podem estar associados ao PD, como a formação de uma camada superficial de solo compactado, ligada ao tráfego de máquinas em condições inadequadas de umidade do solo, capaz de reduzir o crescimento radicular das culturas (Collares et al., 2006).

Neste contexto, o preparo do solo é uma operação crítica nos sistemas de produção agrícola, principalmente no que se refere à elevada intensidade com que é praticada. Em âmbito mundial, os sistemas de preparo sem emprego de revolvimento do solo aumentaram em 230% nos últimos 10 anos, chegando a 111 bilhões de hectares em 2009 (Soane et al., 2012), enquanto no Brasil, até o ano de 2006, o PD já ocupava 25,5 milhões de hectares (Febrapdp, 2006).

No PD, o revolvimento do solo é minimizado, e os restos culturais permanecem na superfície do solo, aumentando o teor de carbono principalmente na camada de 0 a 5 cm de profundidade. Além disso, o PD é uma prática de manejo que pode aumentar a produtividade das culturas, além de mitigar os processos de degradação do solo (Derpsch et al., 2010). Entre as vantagens desse sistema estão o controle da erosão eólica e hídrica do solo, a conservação da umidade e temperatura do solo, o aumento na eficiência na ciclagem de nutrientes, a melhora da estruturação do solo, a redução no consumo de combustível, a conservação do



maquinário e a maior amplitude de períodos para a realização da semeadura (Babujia et al., 2010). Além disso, o emprego adequado do PD reduz distúrbios físicos na estrutura do solo, comparado ao PC. As variações na alocação de carbono no solo, umidade e temperatura afetam a distribuição e condições de crescimento da microbiota do solo. A biomassa microbiana do solo, bem como a atividade de enzimas são normalmente superiores em solos sob PD (Lisboa et al., 2012). Solos sob esse sistema, nas camadas superficiais, possuem maior diversidade de microrganismos do que aqueles cultivados com PC, entretanto, o oposto pode ser observado em camadas mais profundas.

Por sua vez, os sistemas de culturas podem influenciar o solo no que se refere à disponibilidade de nutrientes, profundidade de exploração radicular, quantidade e qualidade dos resíduos vegetais aportados. Com isso, a atividade e a diversidade microbiana são alteradas (Balota et al., 2004), bem como as condições físicas (Albuquerque et al., 1995) e químicas do solo (Bayer e Mielniczuk, 1997). A diversidade vegetal dentro de um sistema de produção exerce grande influência sobre a estrutura da comunidade microbiana do solo, seja em função da atividade rizosférica, seja pela quantidade e qualidade do C aportado ao sistema em forma de resíduos vegetais (Wieland *et al.*, 2001).

Sendo assim, o manejo do solo gera impactos sobre a estrutura e função da comunidade microbiana do solo agrícola (Wu et al., 2007). O aumento do aporte e da manutenção do carbono no solo, tanto em qualidade quanto em quantidade, via sistema de preparo ou por meio de sistemas de cultura, eleva a atividade microbiana do solo, constituindo-se em um dos fatores indutores do processo de supressão de doenças (Termorshuizen et al., 2006).

As práticas de manejo possuem forte influência sobre atributos microbiológicos do solo, e por consequência, vão afetar diretamente o seu potencial supressivo a fitopatógenos (Mazzola, 2004). Perturbações geradas no

solo, em função do preparo e do sistema culturas, determinam modificações nas condições originais do solo. Essas alterações ocorrem em virtude da intensidade da mobilização do solo, do aporte diferenciado de material orgânico, o qual é determinado pelas culturas empregadas, bem como da disposição do resíduo vegetal no perfil do solo (Vargas e Scholles, 2000). Quando uma prática de manejo do solo provoca um distúrbio, são geradas variações na biomassa microbiana e na sua atividade (Lisboa et al., 2012), o que, por consequência, pode interferir na manifestação da supressividade do solo.

Garbeva et al. (2006) observaram uma correlação positiva entre a diversidade microbiana do solo e a redução do desenvolvimento da hifa de *Rhizoctonia solani* em solos sobre diferentes sistemas de manejo. O impacto das práticas de manejo do solo sobre a composição das comunidades de *Bacillus* e *Pseudomonas* também foi observado pela identificação de uma correlação negativa da diversidade destas comunidades com o tamanho da hifa de *R. solani*. Relações positivas entre diversidade microbiana e supressão geral de doenças também foram encontradas para outros fitopatógenos (Nitta, 1991; Benitez et al., 2007; Postma et al., 2008).

A supressão não depende somente de características do solo, mas também das espécies vegetais cultivadas (Bailey e Lazarovist, 2003; Bonanomi et al., 2007). As plantas possuem a capacidade de estimular diferencialmente a comunidade microbiana do solo, em função da intensidade da atividade rizosférica gerada, particular para cada espécie vegetal (Garbeva et al., 2006; Hartmann et al., 2009).

Em solos não agrícolas e com alta biodiversidade de microrganismos, é rara a ocorrência de epidemias de doenças de plantas, em comparação com solos manejados (Schippers, 1992). Por outro lado, sistemas baseados em monocultura conduzem à redução das colheitas, também em virtude do aumento da incidência de importantes doenças vegetais (Rodriguez-

Kabana e Canullo, 1992). Todavia, a supressividade pode ser induzida nesses solos por meio do emprego de práticas de manejo que potencializem a atividade microbiológica (Cook e Baker, 1983).

As práticas de manejo, incluindo rotação de culturas (Mazzola e Gu, 2002) e preparo de solo, são capazes de influenciar as populações microbianas do solo envolvidas com a supressão de doenças, o que gera a possibilidade de manejar e aumentar a supressividade do solo por meio da aplicação de práticas agronômicas apropriadas (Pankhurst et al., 2002). Graberva et al. (2006) observaram que o manejo do solo influenciou a diversidade microbiana, causando também impacto sobre o potencial supressivo. Naquele trabalho, solos sob pastagem permanente, comparados com solos sob PC, mostraram diferenças na estrutura e diversidade da comunidade microbiana do solo, bem como no potencial supressivo a *R. solani*, com níveis de supressividade mais elevados nas áreas de pastagem quando comparados com o PC.

Os sistemas de culturas possuem diferentes impactos sobre as características e a atividade da microbiota do solo, podendo determinar o desenvolvimento da supressão de doenças. Por exemplo, o cultivo sucessivo de trigo aumentou a supressividade do solo contra o patógeno *G. graminis* var. *tritici*, como demonstrado por Raaijmakers e Weller (1998). Os autores observaram que a sequência de cultivos com trigo induziu a seleção de populações de *Pseudomonas* produtoras de 2,4-diacetilfluoroglucinol (2,4-DAPG) a partir da comunidade microbiana pré-existente no solo. Por outro lado, em trabalho que avaliou os efeitos de diferentes sistemas de culturas, Peters et al. (2003) identificaram que o emprego de rotação de culturas aumentou a supressão de doenças pelo aumento da presença de bactérias antagonistas endofíticas e rizosféricas associadas com as culturas da batata e cevada.

## 2.3 Mecanismos de Ação

A redução de doenças em solos supressivos envolve diferentes mecanismos de ação relacionados com a atividade microbiana do solo. Considera-se a existência de cinco diferentes mecanismos relacionados à supressão (Hadar et al., 2012):

- a) A competição por fontes de carbono e demais nutrientes: nesse caso destaca-se a capacidade de muitos microrganismos do solo que produzem moléculas conhecidas como sideróforos, as quais tem a capacidade de sequestrar o Fe do meio, o que acarreta em uma vantagem competitiva a estes organismos em detrimento aos demais, nesse caso, os fitopatógenos;
- b) A produção de antibióticos ou outros compostos com ação tóxica sobre organismos fitopatogênicos: nesse caso enquadram-se antibióticos como o fluoroglucinol produzido por bactérias do gênero *Pseudomonas*;
- c) A predação ou parasitismo direto de organismos que produzem substâncias com propriedades líticas, como a enzima quitinase, sobre fitopatógenos;
- d) A Indução de resistência sistêmica vegetal;
- e) O Aumento do vigor da planta.

Esses mecanismos podem atuar de forma isolada, caracterizando um processo supressivo do tipo “específico”, ou então ocorrer simultaneamente, identificando assim um processo de supressão do tipo “geral” (Whipps, 2001).

### 2.3.1 Produção de Sideróforos

Os solos brasileiros, tipicamente tropicais e subtropicais, são caracterizados pelo intenso processo de intemperismo físico e químico em sua gênese. O resultado é a ocorrência de elevados teores de óxidos de Fe nesses solos, o que, entretanto, não necessariamente indica alta disponibilidade desse

nutriente para os vegetais e microrganismos, principalmente em condição de sequeiro, sob a qual predomina a forma oxidada  $\text{Fe}^{3+}$ , de baixa solubilidade (Solano et al., 2008).

A concentração requerida de Fe no solo para o desenvolvimento das bactérias em geral ( $10^{-7}$  a  $10^{-5}\text{M}$ ) é superior àquela demandada para o crescimento normal de plantas ( $10^{-9}$  a  $10^{-4}\text{M}$ ) (Andrews et al., 2003). Entretanto, muitas bactérias possuem a capacidade de produzir substâncias que complexam o Fe, disponibilizando-o para a absorção microbiana (Braun et al., 1998; Hartmann et al., 2009). Estes compostos, chamados de sideróforos, são moléculas orgânicas que possuem alta afinidade com  $\text{Fe}^{3+}$ , que, após formar um complexo estável com o metal, podem ser captadas por um receptor específico, situado na membrana externa da bactéria, e, uma vez no interior da célula microbiana, o Fe é disponibilizado para o seu metabolismo (Siddiqui, 2005). A produção de sideróforos pela microbiota do solo é um mecanismo promotor de supressão a doenças, pois inibe crescimento de fitopatógenos através da redução da disponibilidade de Fe no ambiente, e também pela vantagem competitiva na rizosfera em relação aos patógenos (Solano et al., 2008).

### **2.3.2 Produção de Compostos Antimicrobianos**

#### **2.3.2.1 Compostos Não Voláteis**

Bactérias de diversos gêneros são capazes de produzir antibióticos capazes de atuar contra uma série de organismos fitopatogênicos, sendo o grupo das *Pseudomonas* o mais estudado (Botelho et al., 2006).

O exemplo mais bem descrito na literatura do controle de doença causada por fitopatógeno habitante do solo é o controle de *G. graminis* causador do mal-do-pé do trigo (*Take-all*), por meio do antibiótico 2,4-diacetilfluoroglucinol (DAPG) produzido por *Pseudomonas fluorescens*, de

ocorrência natural em solos com a presença deste fitopatógeno (Weller, et al., 2002).

Além do DAPG, existem inúmeros relatos da produção de metabólitos antifúngicos produzidos *in vitro* por rizobactérias que potencialmente possuem atividade *in vivo*. Dentre estes pode-se citar:  $\text{NH}_4^+$ , butirolactonas, HCN, canosamina, oligomicina A, oomicina A, ácido fenazina carboxílico (PCA), piluterina (Plt), pirrolnitrina (PIn), vicosinamida, xantobaccina e zitermicina A (Whipps, 2001).

#### **2.4.2.2 Compostos Voláteis**

O efeito supressivo do solo a doenças vegetais pode ser desencadeado pela ação fungistática de compostos voláteis encontrados no solo. A maioria dos compostos voláteis identificados no solo é de origem microbiológica, e as atividades dessas substâncias variam de acordo com as alterações na comunidade microbiana do solo (Bastos e Magan, 2007; Insam e Seewald, 2010). No âmbito da microbiota do solo, fungos e bactérias possuem capacidade de sintetizar e emitir compostos voláteis. A maior parte dessas substâncias tem caráter lipofílico, possuindo baixa massa molecular (menos do que 300 Da) e alta pressão de vapor (0,01 kPa ou mais em temperatura de 20°C), propriedades que conferem a volatilidade .

Em geral, são pequenas moléculas capazes de difundirem-se através de soluções aquosas e espaços porosos do solo. A atividade fungistática dessas moléculas pode variar espacialmente na escala de micrometros até metros, dessa forma podendo atuar sobre microrganismos separados fisicamente (Wenke et al., 2010).

Xu et al. (2004) avaliaram a produção de compostos voláteis em 146 diferentes amostras de solos e identificaram correlação entre a inibição da germinação de esporos e o contato com compostos voláteis. Os produtos voláteis envolvidos com a fungistase são um importante exemplo de como

metabólitos gerados pela comunidade microbiana do solo podem, mesmo sem a existência do contato físico entre os organismos, gerar o processo de supressão.

#### **2.4. Indicadores Bioquímicos de Supressividade**

O impacto de distúrbios causados pelo manejo sobre a capacidade supressiva de um solo pode ser avaliado de forma direta por meio da realização de bioensaios, os quais podem focar as interações entre patógeno/solo/planta (doença) ou então solo/patógeno (persistência do agente causal), possibilitando, assim, à verificação do efeito de um determinado manejo sobre esta propriedade. Contudo, a execução deste tipo de avaliação por si só não explica como a supressividade se manifesta. Por outro lado, a identificação da existência de correlação entre os dados coletados em bioensaios e de parâmetros microbianos de qualidade do solo, estes associados com mecanismos do processo supressivo, pode fornecer subsídios para o desenvolvimento de ferramentas que permitam uma rápida avaliação da condição de um solo submetido a um determinado manejo, em relação ao risco potencial do estabelecimento de patógenos (Van Bruggen e Semenov, 2000).

Bonanomi et al. (2010) observaram que o emprego de parâmetros bioquímicos, como atividade enzimática do solo, respiração basal, biomassa microbiana e identificação de microrganismos antagonistas, tem potencial para a predição da ocorrência da supressão de doenças. De forma semelhante, Rasmussen et al. (2002), por meio da realização de bioensaios para avaliar a supressividade de diferentes solos sobre a incidência de *Fusarium culmorum* em cevada, identificaram correlações positivas e significativas entre a supressão do patógeno, a atividade de enzimas e o teor de matéria orgânica (MO) do solo.

### 2.4.1 Atividade e Biomassa Microbiana do Solo

A biomassa microbiana do solo (BM) é considerada como a fração viva da MO do solo, excluídas a macrofauna e as raízes das plantas, sendo determinante em funções ligadas à ciclagem de nutrientes (Figueiredo et al., 2010).

A biomassa microbiana do solo pode ser determinada por diversas maneiras, como pelo método clássico da fumigação com clorofórmio (Jenkinson, 1966; Jenkinson e Powlson 1976). Segundo Janvier et al. (2007) a ocorrência da supressividade está relacionada com o incremento da biomassa microbiana global do solo. Este aumento propicia um ambiente com maior competitividade, o qual é deletério aos organismos fitopatogênicos.

O aumento da biomassa microbiana do solo é o resultado de muitos sistemas de manejo, por meio do aumento da adição de resíduos orgânicos no sistema. A redução de uma série de doenças radiculares, como aquelas provocadas por *Rhizoctonia solani* no trigo são atribuídas ao aumento da biomassa microbiana do solo (Pankhurst et al., 2002).

A biomassa microbiana está associada com a atividade respiratória da microbiota do solo, podendo ser analisada pela emissão de CO<sub>2</sub>, que resulta da oxidação da matéria orgânica pelos microrganismos de metabolismo aeróbio. Este parâmetro é um importante complemento para a determinação da BM, tendo em vista que ela informa o quanto está ativa a comunidade microbiana do solo para uma determinada biomassa. Lisboa et al. (2012) afirmaram que tanto a atividade quanto a biomassa microbiana são parâmetros que apresentam sensibilidade para indicar alterações promovidas por sistemas de manejo de solo, em função da relação que estes apresentam com o teor de MO.



### 2.4.2 Atividade Enzimática do Solo

A atividade de enzimas do solo é um parâmetro capaz de identificar alterações na comunidade microbiana em função da aplicação de diferentes sistemas de manejo (Bandick e Dick, 1999). Estas moléculas são classificadas, em relação aos locais onde atuam, como intra ou extracelulares. As enzimas intracelulares catalisam reações constitutivas no interior da célula microbiana, enquanto as extracelulares são programadas para atuarem fora da célula degradando substratos maiores e mais complexos, que não podem ser transportados para seu interior (Alef e Nannipieri, 1995). Estas moléculas permitem com que a comunidade microbiana do solo tenha acesso a nutrientes presentes na MO do solo.

As enzimas extracelulares, produzidas por microrganismos do solo, desempenham importante papel na ciclagem da matéria orgânica, atuando em ciclos de diferentes elementos, como do enxofre, fósforo e nitrogênio. Cada vez mais a avaliação da atividade destas enzimas está sendo utilizada como indicador da qualidade solo (Avidano et al., 2005; Roldán et al., 2003; Roldán et al., 2007, Lisboa et al., 2012). Além disso, existem trabalhos que demonstram a correlação positiva entre a atividade de enzimas com a capacidade supressora do solo, como no caso da atividade da enzima  $\beta$ -glicosidase, ligada ao ciclo do carbono, e a redução do *dumping-off* do centeio causada por *Fusarium culmorum* (Rasmussen et al., 2002). Também há enzimas cujas atividades estão diretamente ligadas ao mecanismo de supressão de fungos fitopatogênicos no solo, como o caso das  $\beta$ -glicosaminidases (quitinases) que promovem a degradação da quitina, importante componente da parede celular de fungos, sendo utilizada por organismos biocontroladores como *Trichoderma* sp. (Parham e Deng, 2000). Dessa forma, além da disponibilização de nutrientes, as enzimas podem possuir outras funções em processos específicos, podendo também apresentar atividade supressiva a fitopatógenos de origem fúngica (Baldrian et al., 2008).

### 2.4.3 Diversidade Genética

O solo agrícola é um grande reservatório de diversidade genética de bactérias responsáveis pela produção de antibióticos, enzimas, biorremediação, promoção de crescimento vegetal e controle de doenças vegetais, atividades desempenhadas em grande parte por grupos bacterianos não cultiváveis, portanto não passíveis de isolamento e conseqüentemente inviabilizando a produção de inoculantes (Topp, 2003).

O conjunto da diversidade microbiana do solo ainda não é totalmente conhecido, e provavelmente representa hoje a grande última reserva de biodiversidade do planeta (Torsvik et al., 1990; Tiedje et al., 1999; Prosser, 2002, Ceja-Navarro et al., 2010). Entretanto, o uso de técnicas moleculares abriu uma nova janela para esta observação, a qual foca também na diversidade de organismos não cultiváveis (Kirk, et al., 2004). As ferramentas moleculares ampliaram as possibilidades de estudos da ecologia microbiana em relação ao entendimento das relações funcionais dos microrganismos do solo bem como das interações microbiota-planta, e no estudo do processo de supressividade, microbiota-fitopatógeno-planta (Mazzola, 2004).

Com o emprego de métodos moleculares para a determinação da diversidade genética dos microrganismos do solo tornou-se possível a obtenção de resultados mais precisos do que aqueles alcançados com métodos que envolviam emprego de meios de cultura, os quais, conseguem identificar cerca de 1% da diversidade microbiana do solo (Kirk et al., 2004). A utilização destas técnicas pode auxiliar a compreensão de quais fatores abióticos alterados pelos diferentes manejos do solo podem influenciar a diversidade bacteriana do solo. Algumas técnicas mais simples, que requerem equipamentos menos sofisticados, vêm sendo utilizadas há vários anos com bons resultados. Técnicas como a análise da região espaçadora do gene 16S

(RISA, do inglês *Ribosomal intergenic spacer analysis*) e da análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição do DNA (RFLP, do inglês *Restriction fragment length polymorphism*) (Ranjard et al., 2001) permitem uma avaliação da diversidade da comunidade bacteriana total (Ranjard et al., 2001; Wakelin et al.; 2009) a partir de DNA extraído diretamente do solo (Soares et al., 2006) ou de bactérias isoladas e posteriormente caracterizadas (Beneduzi et al., 2008; Farina et al., 2012). No caso da RISA, a técnica é baseada na variação do espaço intergênico das subunidades ribossômicas 16S e 23S do rDNA. Contudo, a informação obtida a partir desses métodos é limitada. Técnicas mais recentes, baseadas no sequenciamento de última geração (NGS, do inglês *Next-Generation Sequencing*) (Caporaso et al., 2010; Quadros et al., 2012; Campos et al., 2013) permitem a obtenção de um número maior de informação em um tempo reduzido, evidenciando que a diversidade e densidade populacional de comunidades microbianas que habitam a biosfera são muito maiores que as estimativas anteriores baseadas em bactérias cultiváveis e sequências da subunidade pequena do rDNA (16S rDNA).

O NGS permite o sequenciamento de um grande número de fragmentos de DNA, a partir de amostras complexas ou transcriptomas de maneira rápida e com custos cada vez mais reduzidos (Angly et al., 2006; Lazarevic et al., 2009). Dentre as tecnologias de NGS disponíveis, o sequenciamento, via a técnica de “Terminadores Reversíveis” (Illumina), é particularmente adequado para estudos de ecologia microbiana por fornecer fragmentos relativamente longos em comparação com outras tecnologias de NGS, e, portanto, tem sido amplamente adotado por pesquisadores dessa área (Niedringhaus et al., 2011).

### **3. HIPÓTESE**

A partir da fundamentação teórica até aqui desenvolvida, foi formulada a seguinte hipótese:

Práticas de manejo que incrementam a matéria orgânica do solo aumentam a biomassa e a diversidade microbianas e estimulam sua atividade. Como consequência, aumentam o potencial supressivo dos solos.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Tratamentos e Amostragens

O estudo foi realizado em experimento de manejo de solo de longa duração, instalado em 1983 na Estação Experimental Agronômica da UFRGS (30°50'52"S, 51°38'08"W), em um Argissolo Vermelho distrófico típico (Embrapa, 2006). O clima regional é classificado como subtropical de verão quente úmido do tipo fundamental Cfa, conforme a classificação de Köppen (Brasil, 1969).

Foram avaliados dois sistemas de preparo do solo (plantio direto e preparo convencional) e três sistemas de culturas. Os métodos de preparo de solo ocupam as parcelas principais e as sucessões de culturas, as subparcelas. As parcelas principais, com 300 m<sup>2</sup> (15x20m), receberam os dois métodos de preparo de solo. As operações de preparo de solo foram efetuadas apenas antes da implantação das culturas de verão. O preparo convencional consistiu de uma aração e duas gradagens. O PD consistiu na semeadura sem o preparo do solo, sobre os resíduos das culturas anteriores. As culturas de inverno foram semeadas diretamente sobre os resíduos das culturas de verão, sem preparo de solo

Nas subparcelas, de 100 m<sup>2</sup> (5x20m), foram implantados três sistemas de sucessões de culturas: aveia preta (*Avena strigosa*) + vica (*Vicia sativa*) / milho (*Zea mays*) + caupi (*Vigna sinensis*); aveia preta / milho e vica / milho (Figura 1). A condução das culturas quanto ao manejo da fertilidade do

solo, a escolha de variedades, a densidade de semeadura e tratos culturais foi realizada de acordo com as recomendações técnicas específicas para cada cultura, exceto que no experimento não houve o aporte externo de nitrogênio com uso de fertilizantes.

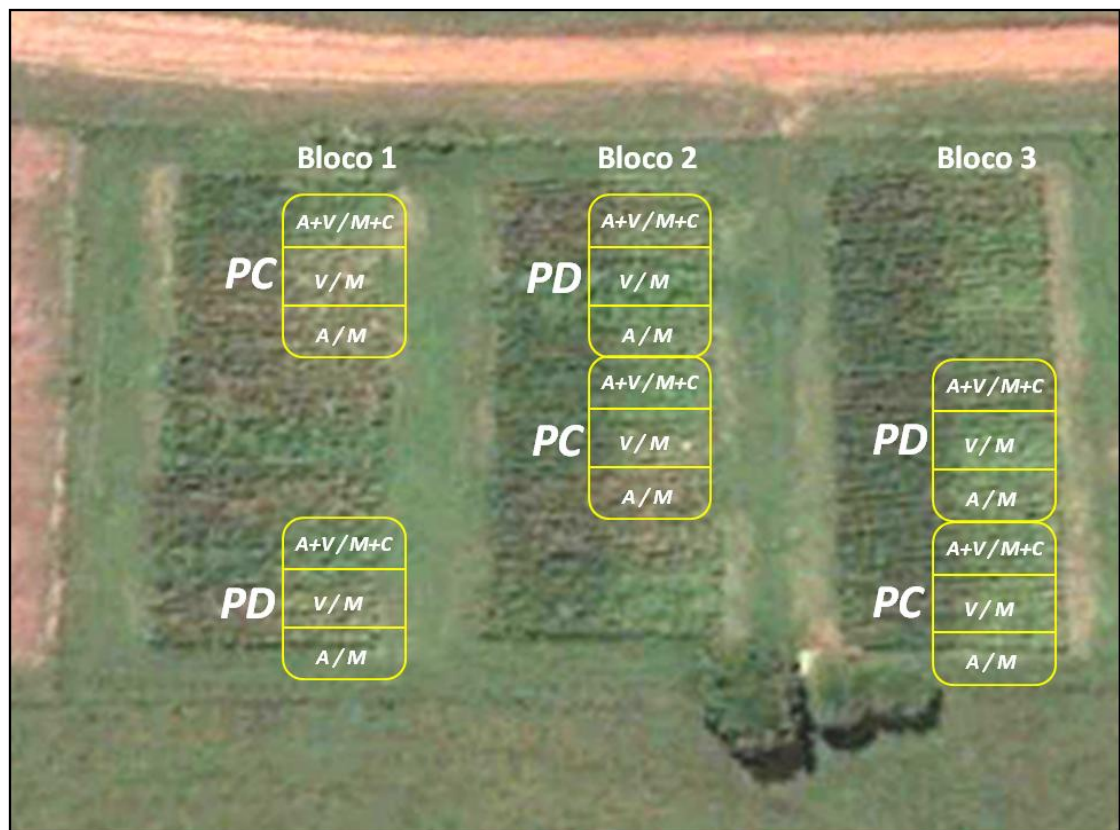


Figura 1. Croqui do experimento, destacando a disposição dos blocos e as parcelas principais relativas ao sistema de preparo de solo e as subparcelas indicando os sistemas de culturas (PD = Plantio direto, PC = Preparo convencional, A+V/M+C = aveia + vica / milho + caupi, V/M = vica/milho e A/M = aveia/milho).

As amostras para a realização das análises previstas no trabalho foram constituídas por 15 subamostras coletadas de forma completamente casualizada em cada repetição, com auxílio de um trado calador, na profundidade de 0-7 cm, a partir das quais também foi realizada a caracterização química (Tabela 1). A coleta das amostras foi efetuada em 02/12/2010, ocasião em que a cultura do milho encontrava-se com trinta dias após a germinação. As amostras de solo destinadas para os ensaios *in vitro* e

*in vivo*, determinação da biomassa e atividade microbiana e isolamento de bactérias do solo foram mantidas em temperatura de 4°C por no máximo 10 dias, enquanto as amostras para as análises que envolviam técnicas de biologia molecular foram armazenadas a temperatura de -4°C e para a determinação da atividade enzimática do solo, foram secas ao ar e mantidas em temperatura ambiente por no máximo um mês. As amostras de solo, para todas as análises, foram tamisadas em peneira com malha de 2 mm.

Tabela 1. Análise química do solo nos diferentes sistemas de preparo de solo e culturas. (PD = Plantio direto, PC = Preparo convencional, A+V/M+C = aveia +vica / milho + caupi, V/M = vica/ milho e A/M = aveia + milho).

Sistema	P	K	Argila	MO	pH	SMP	Al	Ca	Mg
	---mg dm <sup>-3</sup> ---		%	%			-----cmol <sub>c</sub> /dm <sup>-3</sup> -----		
A/M (PC)	15,0	152	31	1,7	5,2	5,9	0,3	2,1	1,0
A/M (PD)	53,0	214	26	2,4	5,6	6,0	0,0	2,5	1,4
A+V/M+C (PC)	42,9	154	31	2,4	5,1	5,7	0,5	2,0	1,4
A+V/M+C (PD)	23,9	207	23	3,6	5,1	5,7	0,3	2,8	1,5
V/M (PC)	3,8	132	33	2,0	4,7	5,5	0,8	1,9	0,8
V/M (PD)	26,1	155	26	3,1	4,8	5,5	0,5	2,0	1,6

## 4.2. Bioensaios de Supressividade

### 4.2.1 Bioensaio *in vivo*

Para determinar o potencial supressivo do solo à podridão comum das raízes do trigo, causada pelo fungo fitopatogênico *F. graminearum* (Agrios, 2004) em cada um dos diferentes sistemas de manejo, foi realizado um ensaio *in vivo*, em condições de câmara de crescimento. O isolado do agente causal foi obtido da coleção do Laboratório de Fitopatologia da Faculdade de agronomia da UFRGS. O inóculo, à base de conídios, foi produzido por meio do crescimento do patógeno em meio SNA (*synthetic nutrient-poor agar*) (apêndice 01) incubado a 20°C por 15 dias.

O experimento foi realizado de acordo com a metodologia empregada por Rasmussen et al., (2002), na qual as amostras de solo foram

colocadas em recipientes de 50 mL. Sementes de trigo foram inoculadas com o patógeno empregando-se uma suspensão com concentração de  $1,5 \times 10^6$  conídios/mL, ajustada com auxílio de câmara de Newbauer conforme metodologia descrita por Alfenas et al. (2007).

Em cada vaso foram semeadas três sementes, sendo que cada unidade amostral foi constituída por quatro recipientes, representando cada uma das três repetições do experimento a campo. Areia lavada e autoclavada foi utilizada como condição de mínima supressividade. Os vasos foram mantidos em incubadora a 21°C por 19 dias, com fotoperíodo de 12h.

O índice de doença (ID) foi estimado segundo escore proposto por Knudsen et al. (1999): 0 = sem sintomas; 1 = leve bronzeamento do colo; 2 = moderado bronzeamento do colo; 3 = severo bronzeamento do colo e 4 = planta morta. O índice de cada repetição foi obtido pelas médias das unidades amostrais. A porcentagem de supressão da doença foi determinada conforme seguinte expressão:

$$\% \text{ supressividade} = \frac{\text{ID (areia)} - \text{ID (solo)}}{\text{ID (areia)}} * 100$$

#### **4.2.2. Bioensaio *in vitro***

Para determinar o potencial do solo em suprimir o crescimento do fungo fitopatogênico *F. graminearum* nos diferentes sistemas de manejo, foi realizado um ensaio *in vitro*. Para tal, foi empregada a metodologia proposta por Ghini e Zarone (2001), na qual 50 g de solo, fumigadas ou não com clorofórmio, foram adicionadas em placas de Petri estéreis. Uma fina camada de ágar esterilizado foi adicionada sobre a camada de solo, a fim de atuar como uma interface entre o solo e o patógeno. Por fim, um disco da cultura do isolado do fungo *F. graminearum*, crescido em meio SNA foi adicionado sobre



a camada de ágar solidificada. As placas foram incubadas no escuro, na temperatura de 23° C por período de 4 dias, no qual foi medido o diâmetro de crescimento do fungo no ágar. A supressão foi determinada pela seguinte expressão:

$$\% \text{ supressão} = \frac{\text{Ø não fumigado} - \text{Ø fumigado}}{\text{Ø fumigado}} \times 100$$

### **4.3 Indicadores Bioquímicos**

#### **4.3.1. Atividade Respiratória da Microbiota do Solo**

Para a avaliação da atividade microbiana pela produção de C-CO<sub>2</sub>, foram utilizadas amostras de 50g de solo de cada repetição, as quais foram incubadas em frascos de 1,0 L com vedação hermética. No interior de cada frasco foi colocado um recipiente contendo 8 mL de NaOH 1,0 mol L<sup>-1</sup>. Todas as amostras, além de uma prova em branco, foram incubadas em estufa com temperatura de 23° C por 60 dias. O C-CO<sub>2</sub> produzido foi avaliado a cada 10 dias até 30 dias de incubação. Após, foi analisado aos 45 e 60 dias, O C-CO<sub>2</sub> total produzido em 60 dias de incubação foi calculado pela soma de CO<sub>2</sub> entre cada período de incubação. Para a determinação do C-CO<sub>2</sub> liberado, foram retirados os copos contendo 8mL de NaOH 1,0 mol L<sup>-1</sup>. Em cada recipiente foram adicionados 4 mL de BaCl<sub>2</sub> 10% e 3 gotas de fenolftaleína 2%, titulando-se em seguida com HCl 0,8 mol L<sup>-1</sup>. Após cada determinação os recipientes com NaOH eram substituídos e as amostras incubadas novamente, sob as condições descritas anteriormente. Para cálculo do C-CO<sub>2</sub>, expresso em mg Kg<sup>-1</sup> de solo, utilizou-se a fórmula:

$$\text{C-CO}_2 = \frac{(\text{mL branco} - \text{mL amostra}) \times 6000 \times \text{N HCl} \times \text{FC}}{\text{Massa de solo seco (g)}}$$

onde 6000 é o equivalente-grama do C (multiplicado por 1000 como fator de correção de  $\text{mg g}^{-1}$  para  $\text{mg kg}^{-1}$ ) e FC é um fator de correção da normalidade, calculado por  $\text{N HCl/N NaOH}$ .

#### 4.3.2 Biomassa Microbiana do Solo

Para a determinação da BM foi empregado o princípio da fumigação e incubação (Jenkinson e Powlson, 1976). Foram utilizados frascos de vedação hermética com volume de 1,0 L, nos quais foram adicionadas subamostras de 50g e 49g (base úmida) de solo para as amostras não fumigadas e fumigadas, respectivamente. A fumigação das amostras foi realizada com a adição de 250  $\mu\text{L}$  de clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ) PA, e mantendo-se os frascos fechados por período de 12 horas. Após, os frascos foram abertos em capela de exaustão por pelo menos quatro horas para a eliminação do clorofórmio. O procedimento para a reinoculação das amostras fumigadas consistiu na adição de 1,0g de solo não fumigado em cada frasco. Em cada frasco, foi adicionado um recipiente de 50 mL contendo 8 mL de NaOH com molaridade padronizada de  $1 \text{ mol L}^{-1}$ . As amostras foram incubadas em câmara tipo BOD a  $23^\circ \text{C}$  no escuro, por período de 10 dias, com a umidade ajustada para 70% da capacidade de campo. Foram estabelecidas três provas em branco, as quais foram formadas por frascos de incubação sem solo, contendo apenas o copo plástico com 8 mL de NaOH. Após este período, os frascos contendo o NaOH foram retirados, sendo acrescidos de 3 mL de  $\text{BaCl}_2$  (10%) e 3 gotas do indicador fenolftaleína (solução alcoólica a 2%). A titulação foi realizada com HCl com molaridade padronizada a  $1 \text{ mol L}^{-1}$ . O C liberado na forma de  $\text{CO}_2$  ( $\text{mg Kg}^{-1}$ ) pelos tratamentos fumigado e não fumigado foi calculado de forma idêntica à utilizada para a determinação da atividade microbiana. A determinação da BM foi realizada através da expressão proposta por Horwath et al. (1996):

$$\text{BM} = 1,73\text{F} - 0,56 \text{NF}$$

onde BM é o carbono da biomassa microbiana e F e NF são os valores, em mg Kg<sup>-1</sup> de C-CO<sub>2</sub>, das amostras fumigadas e não fumigadas, respectivamente.

### 4.3.3 Atividade da Enzima Quitinase

Para determinar a atividade da enzima quitinase ( $\beta$ -glicosaminidase - EC 3.2.1.30), foi empregada a metodologia utilizada por Parham e Deng (2000). Empregou-se, no entanto, adaptação proposta por Verchot e Borelli (2005), a qual eliminava o uso do tolueno para inibir a atividade microbiana no processo de análise, tendo em vista que naquele trabalho não foram identificadas diferenças consistentes entre amostras nas quais o inibidor microbiano foi utilizado e aquelas em que não houve adição do mesmo.

A determinação da atividade da enzima quitinase ( $\beta$ -glicosaminidase) é baseada na ação desta sobre o substrato *p*-Nitrophenyl-N-acetyl-b-D-glucosaminide (NAG), formando como produto o *p*-nitrofenol, o qual é extraído por filtração e quantificado por análise colorimétrica. Para cada amostra utilizou-se 1,0 g de solo, colocada em erlenmeyer de 50 mL, sendo adicionado em seguida 4 mL do tampão MUB (apêndice 02), 1 mL de solução NAG (apêndice 03), incubando-se por 1 hora sob temperatura de 37 °C. Após 1 hora, com a finalidade de evitar a dispersão de argilas e de interromper a atividade da enzima, adicionou-se 1 mL de CaCl<sub>2</sub> 0,5 mol L<sup>-1</sup> e 4 mL de NaOH (0,5M). Em seguida filtrou-se a suspensão de solo em um papel filtro Whatman nº 2. A prova em branco foi produzida seguindo os passos anteriores com uma duplicata, porém com o acréscimo da solução de NAG após a incubação. A leitura se deu em espectrofotômetro a 405 nm e o conteúdo de *p*-nitrofenol foi determinado por meio de uma curva de calibração obtida com padrões de 0, 10, 20, 30, 40 e 50 µg de *p*-nitrofenol. Esta curva foi obtida com a pipetagem de 1,0 mL da solução padrão de *p*-nitrofenol (apêndice 04) em 100 mL de água. Em seguida foram pipetadas alíquotas de 0, 1, 2, 3, 4 e 5 mL e ajustado para

5,0 mL. Após, foram adicionados 1,0 mL de  $\text{CaCl}_2$  0,5M e 4,0 mL NaOH (0,5M). E, por fim, procedeu-se a filtração em papel Whatman nº 2. A atividade desta enzima é expressa em  $\mu\text{g}$  de *p*-nitrofenol produzido por hora por grama de solo ( $\mu\text{g } p\text{-nitrofenol h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ solo}$ ).

#### **4.4 Análises de Diversidade Genética**

##### **4.4.1 Extração de DNA Metagenômico da comunidade microbiana do Solo**

Para a extração de DNA microbiano do solo, foi empregado o Kit *Nucleo Spin Soil* (Macherey-Nagel). Foram utilizados 0,30g de solo de cada amostra de campo, conforme protocolo do fabricante. O kit era constituído por três componentes: (I) uma matriz de lise para a liberação do DNA genômico dos microrganismos do solo, (II) reagentes para a homogeneização de proteínas contaminantes e (III) Solução eluidora para liberar o DNA da matriz de sílica, na qual ficam retidas impurezas, como ácidos húmicos. No final do processo de extração, é obtida uma solução de 50  $\mu\text{L}$  com DNA genômico do solo.

##### **4.4.2 Análise do Espaço Intergênico Ribossomal (RISA)**

A diversidade bacteriana do solo foi analisada pela análise do espaço intergênico ribossomal, um método baseado na variabilidade do tamanho da região entre as subunidades ribossomais 16S e 23S. A reação de amplificação para PCR-RISA conteve: 2 $\mu\text{L}$  de DNA molde, 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão de PCR 10X, 0,25  $\mu\text{L}$  de uma solução com 0,25mmol L<sup>-1</sup> de cada DNTP, 1,5 de MgCl, 11  $\mu\text{L}$  de DMSO, 1,25  $\mu\text{L}$  dos oligonucleotídeos iniciadores SD-Bact-1522-bS-20 20 mmol L<sup>-1</sup>, 1,25  $\mu\text{L}$  de oligonucleotídeo LD-Bact-132-aA-18 20mmol L<sup>-1</sup>, 0,2  $\mu\text{L}$  de Taq polimerase, e água ultra pura estéril para o volume final de 25  $\mu\text{L}$ .

A amplificação foi realizada conforme Fisher e Triplett (1999), com um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por dois minutos, seguido por 30 ciclos de amplificação, sendo cada ciclo composto por uma fase com duração de quinze segundos a 94°C, uma fase de quinze segundos a 55°C e uma fase de quarenta e cinco segundos a 72°C; para extensão final procedeu-se a um ciclo extra a 72°C por dois minutos. Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 1,5% em tampão TBE 1X em voltagem constante (70V) . O perfil de bandas no gel foi analisado utilizando-se o programa Bionumerics 7.0, e a similaridade genética entre os tratamentos foi avaliada empregando-se o coeficiente de Jaccard para a análise de agrupamento.

#### 4.4.3 Sequenciamento de última geração (NGS) de genes 16S rRNA

Para a análise da diversidade da população bacteriana do solo foram realizados sequenciamentos de um fragmento do gene 16S rRNA utilizando a técnica de “Terminadores Reversíveis” (Illumina). Inicialmente foram amplificados fragmentos de 466 pb flanqueando as regiões V3 e V4 do gene 16S rRNA, utilizando-se os *primers* 341F (CCTAYGGGRBGCASCAG) e 806R (GGACTACNNGGGTATCTAAT) (Youngseob et al., 2005) modificados com a inserção de parte dos adaptadores específicos para o sistema *Illumina*. Assim, os *primers* passaram a ter a seguinte sequência final:

**341F+adaptador:**5'ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT**CCTAYGGGRBGCASCAG**

**806R+adaptador:**5'GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC**GGACTACNNGGGTATCTAAT**

Foi realizada uma primeira etapa de amplificação, visando à amplificação do fragmento alvo e à incorporação de parte da sequência correspondente aos adaptadores específicos para o sistema *Illumina*. Para a reação de PCR, foram utilizados 50 ng de DNA genômico; 1 X *Buffer for KOD Hot Start DNA Polymerase* (Novagen®); 1,5 mM de MgSO<sub>4</sub>; 0,8 mM de

DNTPs; 0,3  $\mu$ M de cada *primer*, 1 U *KOD Hot Start DNA Polymerase* (Novagen®) e água ultrapura para um volume final de 25  $\mu$ l. As condições da reação de PCR foram: um ciclo de desnaturação e ativação da enzima de 2 min a 95 °C; 35 ciclos compostos por uma etapa de desnaturação a 95 °C por 20 s, uma etapa de anelamento a 56 °C por 10 s e uma etapa de extensão a 70 °C por 10 s; um ciclo de extensão final a 70 °C por 5 min.

A partir dos produtos desta primeira etapa, realizou-se uma segunda amplificação, com a mesma composição da reação anterior, porém utilizando-se um novo conjunto de *primers* que adicionou sequências código únicas para cada amostra. Foram utilizados os *primers forward* 5' AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC[i5] CACTCTTCCCTACACGAC e *reverse* 5' CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT[i7] GTGACTGGAGTTCAGACGTG, sendo i5 correspondente aos índices D501 a D503 e i7 correspondente aos índices D701 a D706, conforme a Tabela 2. As condições da reação de PCR foram: um ciclo de desnaturação e ativação da enzima de 2 min a 95 °C; 15 ciclos compostos por uma etapa de desnaturação a 95°C por 20 s, uma etapa de anelamento a 56 °C por 10 s e uma etapa de extensão a 70 °C por 10s; um ciclo de extensão final a 70 °C por 5 min. O produto deste segundo PCR foi resolvido em gel de agarose a 1% e purificado com *MinElute PCR Purification Kit* (Qiagen®) e submetido ao NGS.

Os sequenciamentos foram realizados no Centro de Biotecnologia da Universidade de Bielefeld, Alemanha. Foi feito uso da plataforma *MiSeq Personal Sequencer* (Illumina®), a qual produz dois pares de ciclos de leituras de 250 bases cada. As amostras foram sequenciadas em uma corrida múltipla. No sequenciamento, utilizou-se o *software* MCS (*MiSeq Control Software*) em sua versão 2.1. Os dados paramétricos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, ao nível de significância de 5%.

Tabela 2. Índices dos adaptadores *Illumina*, composição da sequência e tratamento identificado por cada índice. Índice Sequência Tratamento correspondente solo (Sistemas: A+V/M+C = aveia+vica/milho+caupi, V/M = vica/milho e A/M = aveia/milho, PD = plantio direto, PC = preparo convencional).

Índice	Sequência	Tratamento correspondente
<b>i5</b>		
D501	TATAGCCT	Bloco 1 (1)
D502	ATAGAGGC	Bloco 2 (2)
D503	CCTATCCT	Bloco 3 (3)
<b>i7</b>		
D701	CGAGTAAT	Aveia+Vica/Milho+Caupi (PD)
D702	TCTCCGGA	Aveia+Vica/Milho+Caupi (PC)
D703	AATGAGCG	Vica/Milho (PD)
D704	GGAATCTC	Vica/Milho (PC)
D705	TTCTGAAT	Aveia/Milho (PD)
D706	ACGAATTC	Aveia/Milho (PC)

A análise dos dados de diversidade bacteriana produzidos pelo NGS foi feita por meio de ferramentas de bioinformática específicas para este tipo de dado. O controle da qualidade do sequenciamento foi feito utilizando-se o aplicativo FastQC (<http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc/>). A ferramenta Cutadapt (Martin, 2011) foi empregada para remover os adaptadores das sequências produzidas pelo sequenciamento de alto rendimento, bem como para eliminar sequências que não possuíam a presença do *primer forward* com uma sequência de ao menos 12 bases ou do *primer reverso* com ao menos 14 bases e erros de pareamentos de mais de três bases.

A plataforma QIIME (<http://qiime.org>) foi empregada para a maior parte das atividades de bioinformática, uma vez que fornece a totalidade dos scripts necessários para a análise de dados de alto rendimento. Foram utilizados os seguintes scripts:

`Split_libraries_fastq.py`: permite dividir as bibliotecas, remover os primers e fornece informações sobre a qualidade e quantidade da filtragem. Como os primers foram removidos com o Cutadapt, o script

Split\_libraries\_fastq.py foi utilizado apenas para avaliar a qualidade da filtragem e para estabelecer um ponto de corte de 1 erro a cada 100 bases.

Pick\_OTUs\_through\_OUT\_Table: é um script de fluxo de trabalho utilizado para selecionar unidades taxonômicas operacionais (OTUs) mediante a construção de tabelas de OTUs. Este é um dos passos importantes durante a análise é realizado em várias etapas.

Pick\_otus.py: script utilizado para a geração de arquivos com mapas de OTUs. Nesta etapa, todas as sequências são agrupadas em unidades taxonômicas operacionais com base em sua similaridade. No QIIME, as OTUs são agrupamentos de sequências, muitas vezes destinados a representar algum grau de parentesco taxonômico. Por exemplo, quando as sequências estão agrupadas em 97% de similaridade, cada agrupamento resultante é tipicamente considerado como representando uma espécie. Pick\_otus\_through\_otu\_table.py utiliza a similaridade de 97% como padrão para a formação de OTUs.

Pick\_rep\_set.py: gera um conjunto representativo de sequências. Uma vez que as OTUs podem ser formadas por uma série de sequências relacionadas, este script seleciona uma sequência representativa de cada OTU para análise posterior. Esta sequência representativa será usada para identificação taxonômica e alinhamento filogenético da OTU.

Align\_seqs.py: gera um arquivo de alinhamentos de sequências. Um dos principais objetivos da plataforma QIIME é o de atribuir às leituras do sequenciamento de alto rendimento uma identidade taxonômica, tendo como referência os bancos de dados de sequências conhecidas. Isso fornece informações sobre as linhagens encontradas em amostras microbianas. Por padrão, o QIIME usa o RDP Classifier para atribuir dados taxonômicos para cada sequência representativa gerada a partir do script anterior, o Pick\_rep\_set.py.



Assign\_taxonomy.py: designa uma classificação taxonômica à sequência representativa gerada por o Pick\_rep\_set.py. O RDP classifier é o padrão do QIIME.

Filter\_alignment.py: constrói um alinhamento filtrado de sequências.

Make\_phylogeny.py: constrói árvores filogenéticas.

Make\_otu\_table.py: gera uma tabela de OTUs do tipo Biological Observation Matrix (BIOM) format.

Make\_otu\_heatmap\_html.py: gera um heat map da tabela de OTUs.

Summarize\_taxa.py: resume as unidades taxonômicas e armazena os resultados em uma nova tabela ou anexa a um arquivo existente.

Beta\_diversity.py: calcula a diversidade beta de uma ou mais tabelas de OTUs.

#### **4.4.4. Extração do DNA Genômico dos Isolados Bacterianos**

Para a extração de DNA genômico dos isolados bacterianos foi empregado o Kit “UltraClean<sup>tm</sup>” (MO BIO, inc), a partir de amostra de 1,8 mL da cultura bacteriana crescida em meio LM , conforme protocolo do fabricante Para certificar a purificação do DNA, foram coletadas alíquotas de 1µL e realizada eletroforese em gel de agarose a 1% e corante Blue Green.

#### **4.4.5 Amplificação e Sequenciamento do Gene 16S rDNA dos Isolados Bacterianos.**

As amostras de DNA genômicos dos isolados bacterianos foram submetidas à PCR para a amplificação do gene 16S rRNA. Para isso, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores U968 (AACGCGAAGAACCTTAC) e L1401 (CGGTGTGTACAAGACCC) (Felske et al., 1999), que amplificam fragmentos de aproximadamente 433 pb. A reação de amplificação continha: 2 µL de DNA molde; 2,5 µL de tampão de PCR 10x; 0,25 µL de uma solução com 0,25 mmol L<sup>-1</sup> de cada DNTP; 0,75 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mmol L<sup>-1</sup>; 1,25 µL de cada oligonucleotídeo, 10 mmol L<sup>-1</sup>; 1 U de Taq DNA polymerase (Invitrogen); e água

ultrapura estéril para o volume final de 25 µL. As reações foram realizadas com um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 5 min, seguido por 30 ciclos de amplificação, sendo cada ciclo composto por: 1 fase de desnaturação com duração de 1 min a 94°C, 1 fase de anelamento de 1 min a 56°C e uma fase de extensão de 1 min a 72°C. A extensão final tem um ciclo a 72°C por 5 min. As reações foram realizadas em um termociclador Tonederm Palm (Tonederm Genetic) e os produtos de amplificação foram visualizados após em eletroforese a 70 V por 50 min em gel de agarose 1% corado com Blue Green Loading Dye I (LGC biotecnologia). Foi utilizado o marcador molecular 1 Kb plus DNA ladder (Invitrogen).

Os produtos de PCR do fragmento parcial do gene 16S rDNA foram seqüenciados no Centro de Biotecnologia da UFRGS utilizando o seqüenciador automático *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). As seqüências obtidas foram analisadas com o programa BLASTN (NCBI BLAST® homepage) identificando os isolados em termos de gênero.

## **4.5 Mecanismos de Ação**

### **4.5.1. Isolamento de Bactérias do Solo**

Para a realização dos testes relacionados com mecanismos de ação de antagonismo sobre *F. graminearum*, foi realizado o isolamento de bactérias das amostras de solo em cada um dos tratamentos. Foi empregado método de diluição em série, no qual 10g de solo foram adicionadas em 90 mL de uma solução estéril de 0,85% de NaCl e agitadas em um agitador orbital na rotação de 150 rpm por 15 minutos (Adesina et al., 2007). Alíquotas de 100 µL das diluições de  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  foram inoculadas em placas de Petri com meio Thornton (apêndice 05) e espalhadas com o auxílio de alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 28 °C por oito dias, sendo realizado em seguida o isolamento de bactérias a partir de colônias isoladas, em placas de Petri contendo meio levedura manitol (LM) (apêndice 06). O critério para isolamento foram

características morfológicas como cor, formato de colônia. Os isolados obtidos foram posteriormente crescidos em meio LM líquido e preservados em microtubos contendo 25% de glicerol a temperatura de -4 °C.

#### **4.5.2 Testes de Antibiose**

O potencial de antibiose dos isolados bacterianos sobre o fungo *F. graminearum* foi determinado utilizando-se um teste *in vitro*, adaptado de Shiomi et al. (2008). Da colônia de *F. graminearum* crescida em placa de Petri por 5 dias em meio LM a temperatura de 23°C foi retirado um disco de 1 cm de diâmetro e colocado no centro de uma placa de Petri contendo meio LM. Ao redor da cultura do patógeno foram inoculados quatro diferentes isolados bacterianos, a partir de culturas líquidas as bactérias isoladas do solo crescidas em meio LM, pelo período de três dias a 28°C. As placas foram incubadas em câmara de crescimento na temperatura de 23°C por cinco dias com fotoperíodo de 12 horas. Após este período, no caso da presença de halo de inibição, foi realizada a medição do raio do halo formado. Para cada isolado testado foram empregadas quatro repetições, sendo que um tratamento contendo apenas o patógeno foi utilizado como testemunha.

#### **4.5.3. Antibiose por Compostos Voláteis**

A identificação da produção de compostos voláteis com poder de inibição sobre o crescimento de *F. graminearum*, foi realizada utilizando-se o método das placas invertidas (Romeiro, 2007), o qual consiste no uso do fundo de duas placas de Petri, ambas contendo meio LM, uma com um disco de cultura do patógeno e outra com o isolado bacteriano. Os dois fundos foram unidos com o emprego de fita adesiva, sendo o conjunto (bactéria+fungo) incubado com o fungo disposto para cima, na temperatura de 23°C por quatro dias. Após esse período foi medido o diâmetro da cultura de *F. graminearum*.

Para cada isolado testado foram empregadas quatro repetições, sendo que um tratamento contendo apenas o patógeno foi utilizado como controle.

#### **4.5.4. Teste de Produção de Sideróforos**

Para avaliação da produção de sideróforos pelos isolados microbianos do solo que demonstraram potencial *in vitro* para inibição de *F. graminearum*, estes foram crescidos em meio LM líquido a 28°C sob agitação constante de 128 rpm, por 72h. Ao final desse período, 10 µL da cultura bacteriana foram inoculados em placas de Petri com meio deficiente em ferro King-B (apêndice 07) com a adição do corante CAS (apêndice 8) (Schwyn e Neilands, 1987) a temperatura de 28°C por cinco dias. Ao final desse período, foram considerados isolados produtores de sideróforos aqueles que promoveram a formação de um halo amarelado ao redor da colônia bacteriana, isto é, indicando que o sideróforo capturou o Fe quelado no corante alterando a coloração deste.

#### **4.6 Análises Estatísticas**

O experimento de longa duração do qual foram coletadas as amostras de solo, estava delineado na forma de blocos ao acaso com três repetições, com dois sistemas de preparo de solo e três de culturas, configurando assim, um experimento fatorial do tipo 2 x 3. O teste de Tukey foi utilizado para as comparações de médias para as avaliações de supressividade (*in vivo* e *in vitro*), para biomassa microbiana, atividade microbiana e enzimática. Para os ensaios de antibiose, produção de sideróforos e compostos voláteis foram empregados delineamentos completamente casualizados, e para as análises dos dados, foi utilizado o teste de Skott e Knott para a comparação de médias com o nível de significância de 5% de probabilidade de erro, empregando o programa computacional Assistat (Silva e Azevedo, 2002).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Ensaio de Supressividade

As análises da capacidade supressiva do solo (*in vivo* e *in vitro*), nos diferentes sistemas de manejo, não identificaram interação entre os preparos de solo e sistemas de culturas. Entretanto, foram observadas diferenças significativas nos efeitos isolados.

A Figura 2 apresenta os diferentes níveis de severidade da podridão comum sobre plântulas de trigo, organizados na forma de escore. A intensidade da doença variou desde a não germinação das sementes até a obtenção de plântulas completamente saudias durante a realização do ensaio.

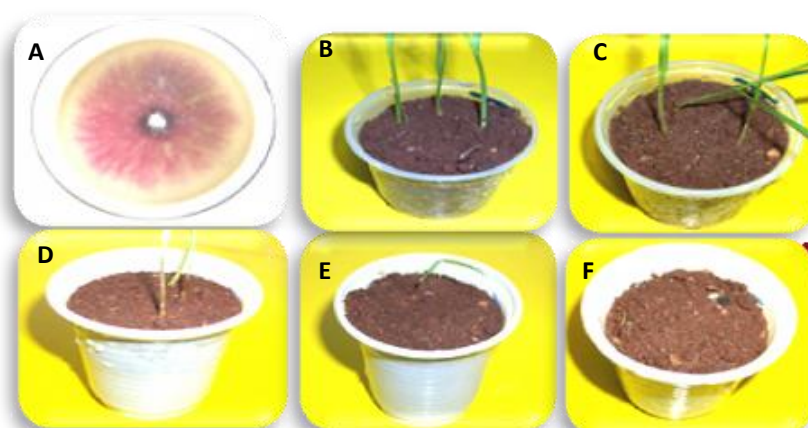


Figura 2. (A) Imagem da colônia de *Fusarium graminearum*, e os vasos com diferentes níveis de severidade da podridão comum do trigo: (B) sem sintomas; (C) leve bronzeamento do colo; (D) moderado bronzeamento do colo; (E) severo bronzeamento do colo e (F) não germinação da semente.

Em relação aos dados obtidos no ensaio *in vitro*, em todos os tratamentos, ocorreu o maior crescimento das colônias de *F. graminearum* nas amostras de solo fumigadas com clorofórmio (média de 5,9 cm) em comparação com as amostras com solo não-fumigado (média de 0,7 cm), resultado semelhante ao obtido por Ghini e Zarone (2001). Naquele trabalho, os autores observaram que o crescimento relativo do patógeno em solo fumigado era maior nas amostras que apresentavam maior potencial supressivo *in vitro*, resultado também encontrado no presente trabalho. Este dado demonstra a participação da comunidade microbiana do solo na geração do processo de supressividade, tendo em vista que a redução da microbiota nativa do solo pela fumigação com clorofórmio permitiu o maior desenvolvimento do patógeno nas placas, nas condições do ensaio.

A evidência do efeito supressivo do solo sobre o desenvolvimento do micélio de *F. graminearum* no ensaio *in vitro* indica a ocorrência de um processo de fungistase, o qual, segundo Garbeva et al. (2011) é um evento típico do solo não rizosférico. Essa região do solo é caracterizada pela baixa disponibilidade de fontes de carbono, as quais são disputadas por bactérias heterotróficas e fungos saprofitos, gerando um ambiente de alta competitividade, dificultando a proliferação de organismos fitopatogênicos.

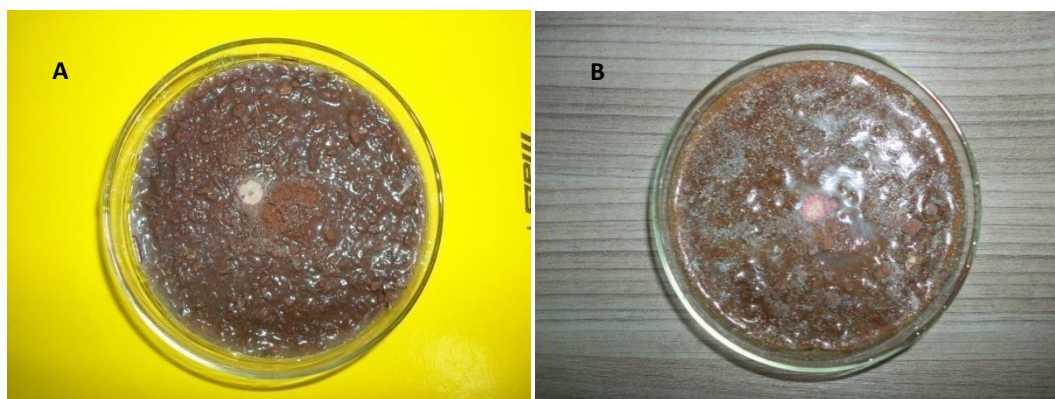


Figura 3. Imagem do teste *in vitro* de supressividade do patógeno *F. graminearum*: placa com ausência de crescimento micelial do patógeno (A) e placa com solo fumigado com clorofórmio, tomada pelo micélio (B).

Em relação aos resultados dos testes de supressão em função do tipo de preparo de solo empregado, a supressão à podridão comum do trigo nas plântulas de trigo (teste *in vivo*) e ao desenvolvimento do patógeno *F. graminearum* (teste *in vitro*) foram significativamente superiores nas amostras de solo sob PD em relação ao PC (Figura 4).

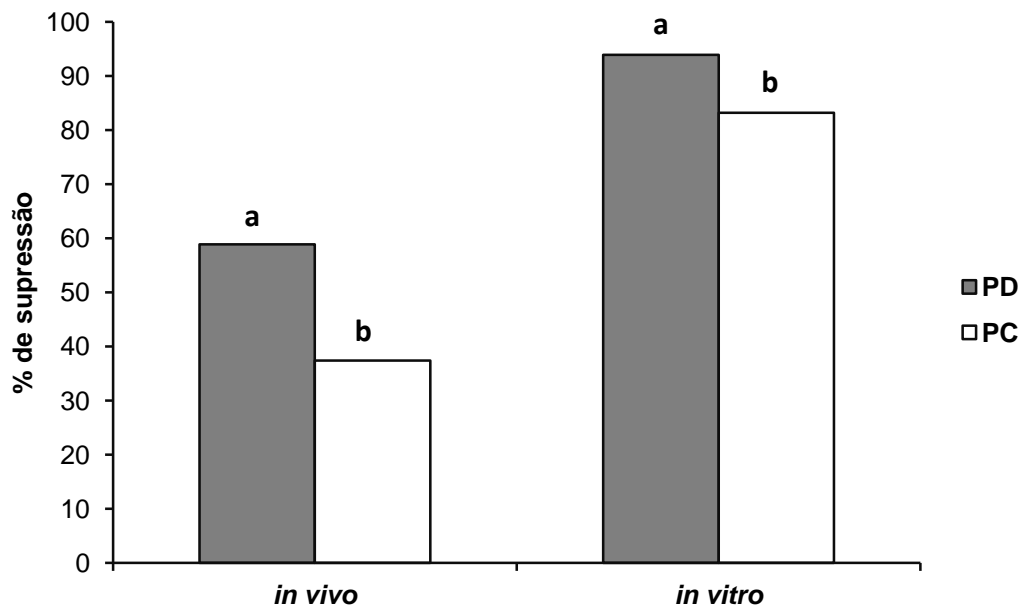


Figura 4. Supressividade *in vivo* e *in vitro* em Argissolo sob diferentes sistemas de preparo de solo. Valores seguidos por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% (PD= plantio direto e PC= preparo convencional).

Estes resultados devem-se ao fato de que sistemas conservacionistas de manejo do solo, como o PD, geram um ambiente de alta competição entre os microrganismos do solo, o que resulta na supressão de doenças (Kurle et al., 2001), processo que nesse sistema de preparo é localizado na camada superficial do solo, zona de maior densidade e atividade radicular (Sturz et al., 1997). Este efeito é relacionado com a manutenção dos teores de matéria orgânica em função do não revolvimento e da permanência dos restos culturais na superfície do solo. De forma inversa, no PC os resíduos

culturais são dispostos, por meio das operações de aração e gradagem, em contato mais íntimo com o solo, o que além de favorecer o rompimento dos agregados, também expõe as frações mais protegidas da MO à degradação microbiana (Garbeva et al., 2011). Esses fatores contribuem, juntamente com a manutenção do solo descoberto, para a redução da MO do solo sob este sistema de preparo (Lee et al., 1993), acarretando na redução da atividade microbiana, o que repercute na capacidade supressiva do solo.

Em relação ao potencial supressivo do solo nos diferentes sistemas de culturas (Figura 5), também foram observadas diferenças significativas. Neste caso, o potencial supressivo do solo foi superior nos tratamentos que possuíam leguminosas incluídas na sucessão.

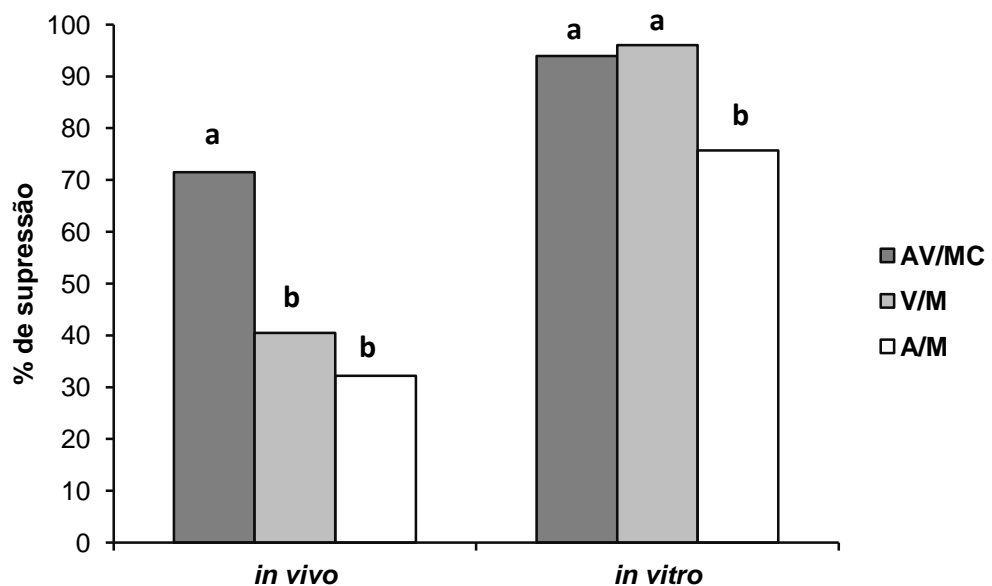


Figura 5. Supressividade *in vitro* e *in vivo* em Argissolo sob diferentes sistemas de culturas. Valores seguidos por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% (Rotações: A+V/M+C = aveia+vica/milho+caupi, V/M = vica/milho e A/M = aveia/milho).

O aumento da complexidade dos cultivos por meio do emprego de um número maior de espécies e a inclusão de leguminosas no sistema, acarreta no incremento da MO e da estrutura do solo (Janvier et al., 2007). Mielniczuk et al. (2003) afirmam que a baixa disponibilidade de N no solo é o



principal fator limitante ao aumento da MO em solos degradados. Dessa forma, a inclusão de leguminosas consorciadas no sistema (vica e caupi), aumentou, por meio da fixação biológica de N, a produção de biomassa vegetal, o que, por consequência, favoreceu acúmulo de C no solo em relação ao sistema que não possuía as leguminosas. Este efeito se tornou mais evidente em função de não haver aporte de fertilizantes nitrogenados nos sistemas de manejo avaliados, sendo, portanto, a fixação biológica a única via de entrada de N no solo.

Também corroborando os resultados obtidos no presente trabalho, Peters et al. (2003), avaliando o resultado do emprego do preparo conservacionista do solo e de diferentes sistemas de culturas sobre a incidência de *Fusarium oxysporum* na cultura da batata, evidenciou-se o efeito benéfico destas práticas de manejo sobre o aumento da supressividade do solo ao patógeno. Sipilä et al. (2012) identificaram uma correlação positiva entre o PD e a supressividade sobre *Fusarium*, concluindo que estratégias de manejo do solo exercem forte influência sobre os processos microbiológicos, e dentre eles, a supressão. Dessa forma, torna-se possível o estabelecimento de algum nível de controle sobre o potencial supressivo de um determinado solo, por meio do emprego adequado de práticas de manejo.

Os resultados obtidos nos bioensaios de supressividade demonstram o potencial supressivo do solo sobre o patógeno, ou seja, resultado da interação solo x fitopatógeno (supressividade *in vitro*) e também o potencial supressivo sobre a moléstia, isto é, resultante da interação dos fatores solo x planta x patógeno (supressividade *in vivo*).

## **5.2 Indicadores Bioquímicos**

Não foram identificadas interações entre os preparos de solo e sistemas de culturas em relação aos indicadores bioquímicos (biomassa, atividade microbiana e enzimática). Entretanto, foram observadas diferenças significativas nos efeitos isolados destes fatores.

### 5.2.1 Atividade e Biomassa Microbiana

Tanto a atividade quanto a biomassa microbiana do solo foram significativamente superiores nos tratamentos sob PD (Figura 6). Portanto, o sistema de preparo do solo apresentou influência sobre o conjunto da biomassa microbiana e de sua atividade, e esta, conforme os resultados dos ensaios de supressividade, exerceu efeito sobre a capacidade supressiva do solo à moléstia e a redução do crescimento do patógeno, conclusão semelhante à obtida por Pankhurst et al. (2002) em trabalho que avaliou o efeito de diferentes sistemas de preparo de solo sobre o potencial supressivo.

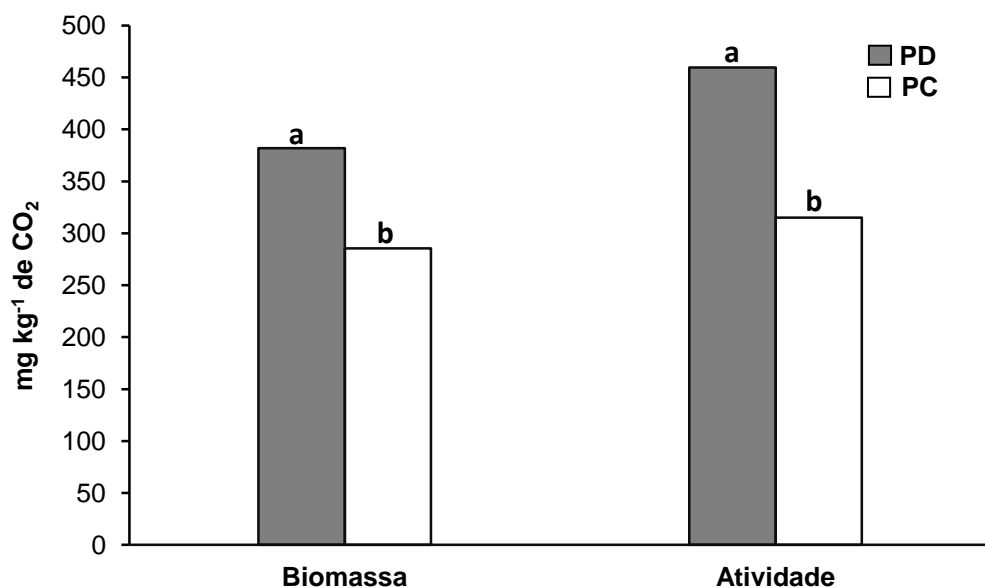


Figura 6. Biomassa e atividade microbiana em Argissolo sob diferentes sistemas de preparo do solo. Valores seguidos por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% (PD= plantio direto e PC= preparo convencional).

Em trabalho realizado por Lisboa et al. (2012), as alterações geradas pelo PD sobre parâmetros bioquímicos do solo, principalmente a elevação dos teores de MO, acabaram por favorecer a comunidade microbiana do solo sob esse sistema de preparo, efeito também observado no presente trabalho.

De forma semelhante ao observado em relação aos sistemas de preparo de solo, os sistemas de culturas que propiciaram uma maior atividade e biomassa microbiana do solo (Figura 7), também foram os que apresentaram os maiores potenciais de supressão ao patógeno e à moléstia.

Neste caso, o sistema de cultura A+V/M+C, que permanentemente emprega o cultivo de uma leguminosa (vica no inverno e caupi no verão), foi o que apresentou as maiores atividade e biomassa microbiana, seguido pelo sistema V/M (utiliza apenas vica no inverno) enquanto a sucessão A/M, na qual não há o cultivo de leguminosa em nenhum momento, gerou os menores valores.

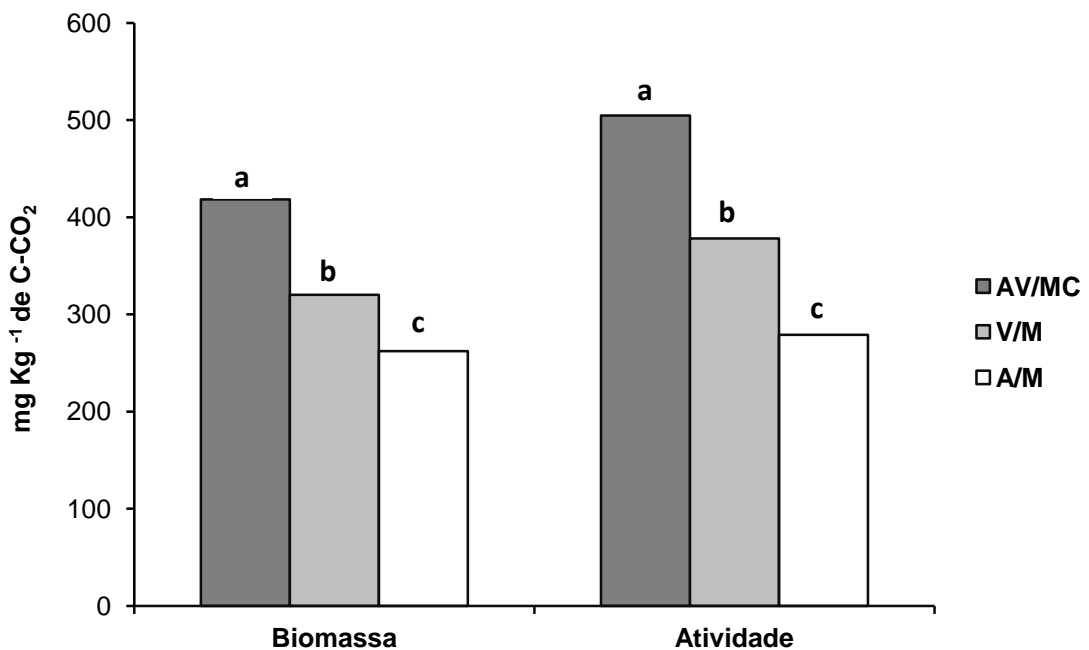


Figura 7. Biomassa e atividade microbiana em Argissolo sob diferentes sistemas de culturas. Valores seguidos por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% (Rotações: A+V/M+C = aveia+vica/milho+caupi, V/M = vica/milho e A/M = aveia/milho).

As correlações entre a atividade, A biomassa microbiana e o potencial supressivo do solo, tanto *in vivo* (severidade da doença) quanto *in vitro* (desenvolvimento do patógeno), podem ser observadas nas Figuras 8 e 9. No que se refere ao potencial supressivo *in vivo*, foram identificados

coeficientes de determinação significativos ( $p < 0,05$ ) tanto para biomassa microbiana ( $r^2 = 0,94$ ) quanto para atividade ( $r^2 = 0,73$ ), o que corrobora os resultados obtidos por Perez-Brandán et al. (2012) que também verificaram correlação positiva entre a atividade microbiana e a redução da incidência do fungo patogênico *Macrophomina phaseolina* em soja. Estas relações entre atividade microbiana e potencial supressivo do solo evidenciam que o fenômeno da supressão à doença está ligado, em grande parte, à biomassa e atividade microbiana.

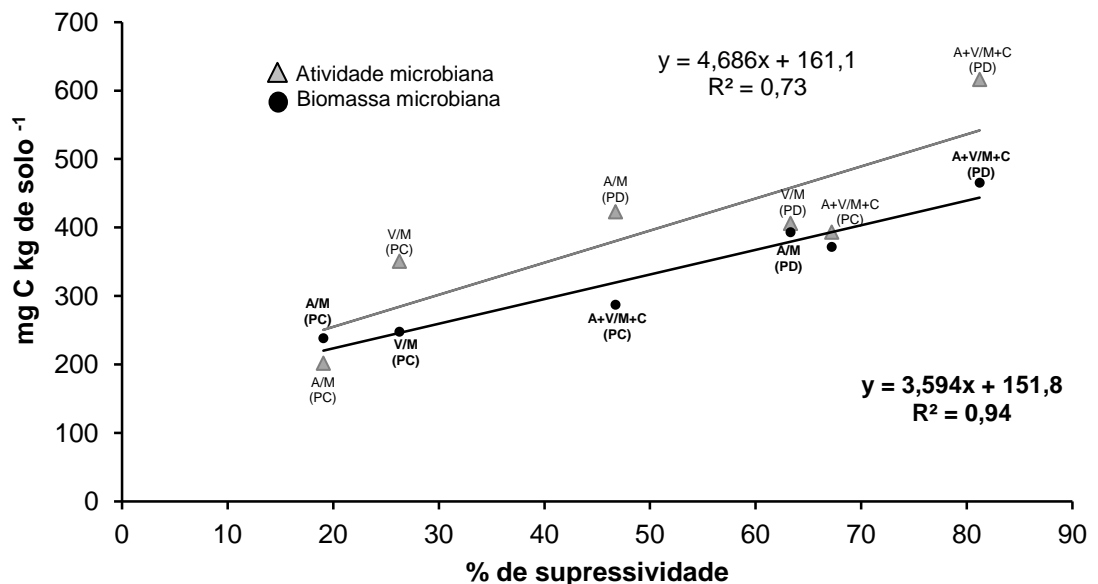


Figura 8. Correlação entre supressividade *in vivo* e biomassa e atividade microbiana do solo (PD = Plantio direto, PC = Preparo convencional, A+V/M+C = aveia +vica / milho + caupi, V/M = vica/ milho e A/M = aveia + milho).

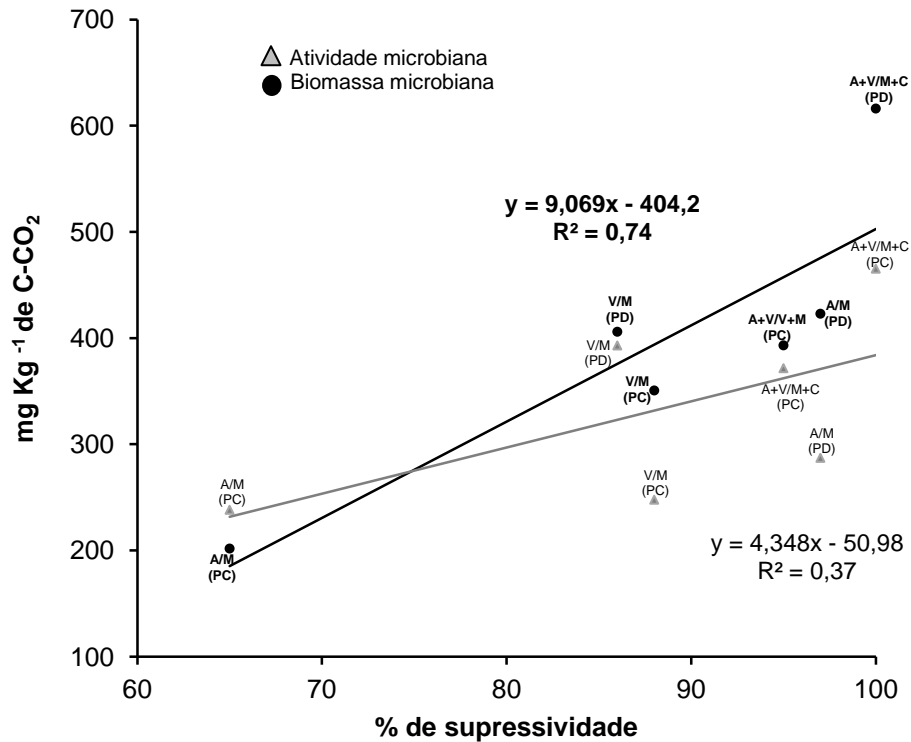


Figura 9. Correlação entre supressividade *in vitro* e biomassa e atividade microbiana do solo (PD = Plantio direto, PC = Preparo convencional, A+V/M+C = aveia +vica / milho + caupi, V/M = vica/ milho e A/M = aveia + milho).

No caso do potencial supressivo *in vitro*, foi também observada uma forte relação deste com a atividade microbiana ( $r^2 = 0,74$  e  $p < 0,05$ ), entretanto, o mesmo não ocorreu em relação à biomassa microbiana ( $r^2 = 0,37$  e  $p > 0,05$ ). De maneira geral, os dados de biomassa e atividade microbiana do solo do presente trabalho estão correlacionados com a manifestação da supressão do solo, resultado que acompanha estudos recentes que, conforme trabalho de revisão de Garbeva et al., (2011), também relacionam o processo de fungistase com parâmetros ligados à atividade microbiana geral do solo. Segundo Peters et al. (2003), esse processo ocorre em virtude do incremento da atividade microbiana, estimulada pelo aumento dos teores de MO do solo resultante do manejo do solo. A consequência destes eventos é a geração de um ambiente de elevada competitividade, desfavorecendo a ocorrência da doença, corroborando os resultados obtidos no presente trabalho, que também

demonstraram o impacto do preparo do solo e dos sistemas de culturas sobre o potencial supressivo do solo.

### 5.2.2 Atividade da Enzima Quitinase

A determinação da atividade da enzima quitinase no solo sob os diferentes sistemas de manejo indicou o efeito do preparo de solo, como demonstra a Figura 10, sobre a atividade desta enzima. A atividade desta enzima no solo sob PD foi superior àquela verificada no PC, sendo observado dessa forma, o mesmo padrão verificado nos dois ensaios de supressividade, bem como na atividade e biomassa microbiana.

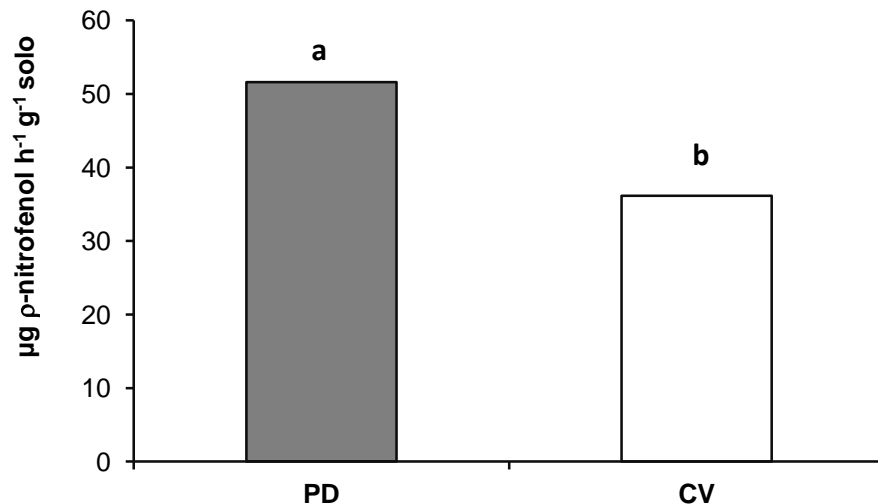


Figura 10. Atividade da enzima quitinase em Argissolo sob diferentes sistemas de preparo de solo. Valores seguidos por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% (PD= plantio direto e PC= preparo convencional).

Em relação aos sistemas de culturas (Figura 11), também foram obtidas diferenças significativas, sendo que o sistema A+V/M+C foi o que mais favoreceu a atividade da enzima, enquanto V/M e A/M não se diferenciaram. Este resultado indicou comportamento semelhante ao observado na avaliação de supressividade *in vivo*. Novamente, como nos indicadores anteriores, foi possível estabelecer uma relação entre a atividade enzimática com o conteúdo de MO do solo nos diferentes sistemas de manejo. Lisboa et al. (2012)

observaram que a atividade de diferentes enzimas foi estimulada em função das maiores atividade e biomassa microbiana em um Argissolo Vermelho cultivado sob PD, efeito que, segundo os autores, está ligado diretamente ao maior acúmulo de MO no solo.

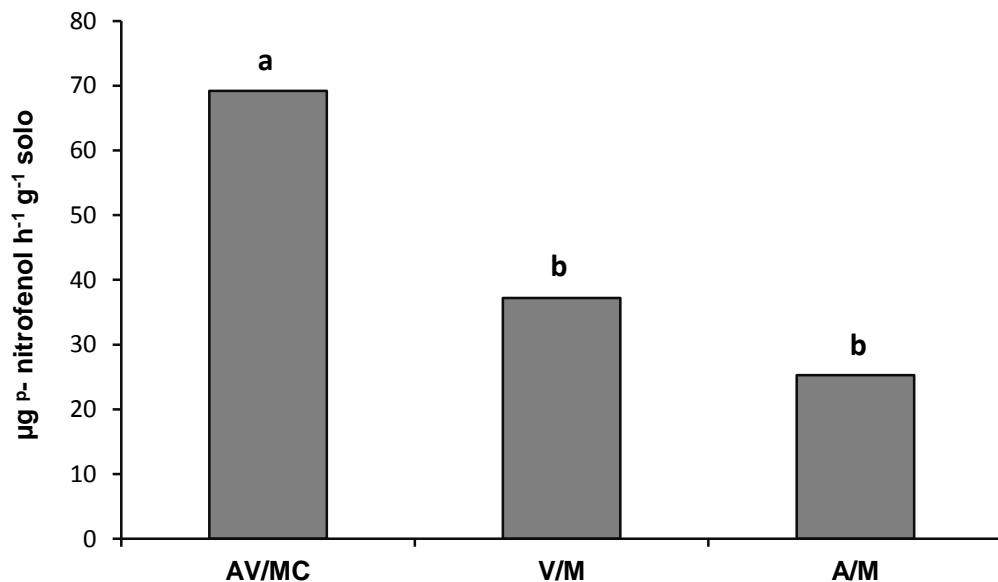


Figura 11. Atividade da enzima quitinase em Argissolo sob diferentes sistemas de culturas. Valores seguidos por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% (Rotações: A+V/M+C = aveia+viça/milho+caupi, V/M = vica/milho e A/M = aveia/milho).

Não foi identificada uma correlação significativa entre a atividade da enzima e a supressão observada *in vitro* e *in vivo* ( $p > 0,05$ ). A atividade da quitinase está envolvida no ciclo do C no solo, mais especificamente à degradação da quitina, biopolímero presente na parede celular dos fungos. Segundo Parham e Deng (2000), a atividade desta enzima pode estar ligada ao processo de controle de fungos fitopatogênicos, tendo em vista uma elevada diversidade de quitinases que são isoladas de fungos da espécie *Trichoderma harzianum*, sendo esta enzima considerada como um dos mecanismos de ação do biocontrole promovido por esse antagonista (Lorito et al., 1994). Provavelmente, os reduzidos coeficientes de correlação observados entre a atividade da quitinase e a supressividade do solo, em relação àqueles obtidos

nos indicadores anteriores, são devidos ao fato de que a análise desta enzima avalia isoladamente apenas um mecanismo de ação, enquanto a atividade e biomassa microbiana e MO tendem a representar de forma mais holística os processos que ocorrem no solo.

### 5.2.3 Matéria Orgânica do Solo

Quando foi realizada a relação entre a matéria orgânica do solo nos diferentes tratamentos e os potenciais supressivos *in vivo* e *in vitro* (Figura 12), foi observada uma correlação significativa ( $R^2=0,81$ ,  $p<0,05$ ) entre o teor de MO e a supressividade *in vivo*.

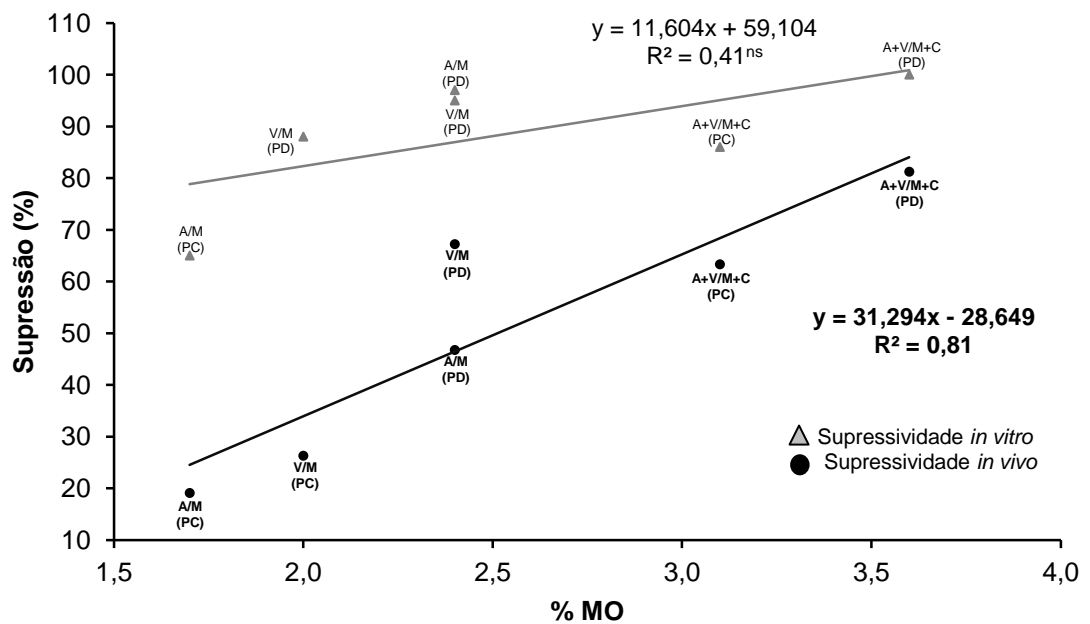


Figura 12. Correlação entre matéria orgânica do solo (0- 7cm) e supressividade *in vivo* e *in vitro* (PD = Plantio direto, PC = Preparo convencional, A+V/M+C = aveia +vica / milho + caupi, V/M = vica/ milho e A/M = aveia + milho).

Este dado vem corroborar os observados nos demais parâmetros (biomassa e atividade microbiana), os quais também apresentaram forte correlação com o potencial *in vivo* de supressão à podridão do trigo. Mais uma vez, fica demonstrado o papel fundamental da microbiota do solo na geração



do processo supressivo, tendo em vista que a atividade microbiana do solo é dependente da MO (Carter, 1991). Por outro lado, não foi significativa a correlação entre a MO e a supressividade *in vitro* ( $R^2=0,41$ ,  $p>0,05$ ).

O efeito supressivo observado nas avaliações no presente trabalho é adequado ao conceito de supressão geral ou “tampão biológico”, no qual a capacidade dos solos em restringir o crescimento e atividade do fitopatógeno é gerada pela atividade microbiana geral do solo, a qual promove um ambiente de elevada competição por recursos ou pelo antagonismo direto por meio de compostos antimicrobianos. Sendo assim, este potencial é passível de ser manipulado mediante a adição de material orgânico no sistema e pela adoção de práticas de manejo que contribuam para a elevação da MO do solo (Weller, 2002).

### **5.3 Diversidade Genética**

#### **5.3.1 Análise do espaço intergênico ribossomal (RISA)**

O perfil da diversidade genética bacteriana do solo, submetido a diferentes sistemas de manejo, obtido por meio da análise do espaço intergênico ribossomal indicou o efeito tanto do sistema de preparo de solo quanto o de culturas sobre a composição genética dos organismos procariotos do solo.

O dendograma gerado pelo padrão das bandas obtidas na eletroforese dos produtos de PCR por meio da análise de agrupamento (Figura 14), em relação ao padrão da diversidade do espaço intergênico ribossomal, inicialmente separou os tratamentos em dois grandes grupos distinguindo os solos manejados sob PD daqueles sob PC. Em cada grupo, se formaram dois subgrupos, discriminando os solos cultivados nos diferentes sistemas de culturas, sendo que um formado pelos sistemas A+V/M+C e V/M, isto é, aqueles com a presença de espécies leguminosas e o outro com o A/M, ou seja, apenas com gramíneas.

Observa-se, dessa forma, que o perfil genético da comunidade procariota do solo sob os diferentes sistemas de manejo obtido pela RISA, conforme os agrupamentos obtidos acompanha a tendência dos resultados dos estudos anteriores, onde o solo submetido ao PD e aos sistemas de culturas com a presença de leguminosas apresentaram maiores atividade e biomassa microbiana, atividade da enzima quitinase, teores de MO e, por consequência, também o maior potencial supressivo à podridão da raiz do trigo. Resultado semelhantes foram obtidos por Rime et al. (2003), que empregaram a RISA para avaliar a diversidade da comunidade procariótica do solo, método que também foi capaz de distinguir estatisticamente solos supressivos de não supressivos.



Figura 13. Similaridade entre os perfis bacterianos da comunidade microbiana de um Argissolo submetido a diferentes sistemas de manejo (agrupamento gerado adotando-se o coeficiente de Jaccard) (Sistemas: A+V/M+C = aveia+vica/milho+caupi, V/M = vica/milho e A/M = aveia/milho, PD = plantio direto, PC = preparo convencional).

### 5.3.2 Sequenciamento de última geração (NGS) de genes 16S rRNA

A partir das avaliações da qualidade das leituras do sequenciamento, optou-se pela análise apenas das sequências *forward*, as quais correspondem à região V3 do 16S rRNA, com fragmentos de ao menos 100 pb, tamanho considerado suficiente para fins de resolução de comunidades bacterianas diferentes (Liu et al., 2007). Estas sequências foram submetidas a uma nova filtragem, utilizando-se o script *split\_libraries\_fastq.py*

para remover sequências com mais de 1% de erros de sequenciamento. Esta filtragem resultou no aproveitamento de 45% a 78% de leituras, resultando, em média, em torno de 40.000 sequências por amostra.

Com este conjunto final de dados, foi feita a análise da comunidade bacteriana nos diferentes sistemas de manejo. Por meio do script *Pick\_OTUs\_through\_OUT\_Table* do *QIIME*, produziu-se uma tabela de unidades taxonômicas operacionais (OTUs), na forma de *heat maps*, a qual lista as espécies ou grupos bacterianos mais expressivos no conjunto de dados (Figura 14).

Grupos	PC									PD									Id OTUs
	A+V/M+C			A/M			V/M			A+V/M+C			A/M			V/M			
<i>Frankiaceae</i>	153	46	112	285	190	114	170	154	80	247	84	223	333	276	210	182	83	232	9100
<i>Kaistobacter</i>	540	870	434	1015	631	316	1029	316	434	609	562	245	401	386	304	887	468	300	9815
<i>Candidatus Solibacter</i>	1059	1035	1084	1355	968	804	1200	837	778	913	646	837	1014	631	890	565	386	470	35279
<i>Rhodospirillaceae</i>	573	1035	816	868	984	877	949	1012	774	1104	1235	1056	1026	921	1130	591	662	549	40845
<i>Candidatus Koribacter</i>	195	146	155	233	144	129	211	95	121	188	67	181	291	112	137	99	50	57	44158
<i>Koribacteraceae</i>	396	332	180	334	182	166	208	89	106	265	96	225	478	129	169	105	48	87	46514
<i>Koribacteraceae</i>	537	739	362	368	432	271	376	178	190	292	191	272	493	227	277	376	146	171	54752
<i>Candidatus Solibacter</i>	242	189	199	440	196	212	184	219	179	169	77	183	105	95	156	75	78	94	54754
<i>Micromonosporaceae</i>	142	80	126	113	118	66	168	107	100	410	203	268	273	306	210	336	245	250	65256
<i>Bradyrhizobiaceae</i>	940	972	962	1332	974	567	867	1133	459	1970	1193	1598	1480	1204	1409	1147	1140	859	79394
<i>Bacillus</i>	86	38	233	665	114	118	407	289	294	184	26	61	79	42	45	96	44	38	86851
<i>Koribacteraceae</i>	420	337	233	336	225	158	280	179	125	348	160	286	434	196	228	202	89	121	94195
<i>Koribacteraceae</i>	239	223	220	239	165	107	287	157	121	188	86	130	133	64	82	164	71	109	99624
<i>Solirubrobacterales</i>	182	83	120	323	131	118	206	145	100	281	91	205	278	190	143	211	125	194	101399
<i>Gaiellaceae</i>	390	228	460	450	288	295	1006	423	511	712	205	494	453	441	406	418	371	522	124826
<i>Rhizobiales</i>	139	180	82	113	103	56	99	64	50	652	620	412	422	250	262	188	213	144	152513
<i>Actinomycetales</i>	365	172	341	549	291	295	296	387	207	512	136	388	595	352	278	244	152	273	152616
<i>Ktedonobacteria</i>	419	351	102	486	278	144	175	53	42	262	136	116	445	107	93	69	28	107	157755
<i>Actinomycetales</i>	170	54	181	373	205	184	236	189	146	132	48	92	158	301	148	214	130	250	168044
<i>Sporichthyaceae</i>	633	359	786	1649	1097	954	947	854	771	341	185	261	430	854	301	370	212	353	168311

Figura 14. *Heat map*, produzido com as principais OTUs por amostra de Argissolo sob diferentes sistemas de manejo (PD = Plantio direto, PC = Preparo convencional, A+V/M+C = aveia +vica / milho + caupi, V/M = vica/ milho e A/M = aveia + milho).

De um modo geral, há uma semelhança entre os tratamentos, com algumas OTUs diferindo. Chamou a atenção o significativo aumento da presença do gênero *Bradyrhizobium* nos tratamentos sob PD (Figura 15),

assim como um aumento, da ordem *Rhizobiales* como um todo, embora não tão evidente. Por sua vez, *Candidatus Solibacter*, uma Acidobacteria que se acredita ser capaz de reduzir nitrato e nitrito, mas não de atuar como fixadora de  $N_2$  ou como desnitrificadora (Ward et al., 2009), apresenta uma contagem de OTUs bastante elevada em solos sob PC.

Espécies do gênero *Bacillus* são capazes de produzir compostos que inibem o crescimento de *F. graminearum* reduzindo os sintomas do patógeno em plântulas de trigo (Zhao et al., 2010). Entretanto, no presente trabalho, foi observada a predominância de OTUs classificadas como *Bacillus* no solo sob PC, isto é, aquele que apresentou o menor potencial supressivo, tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

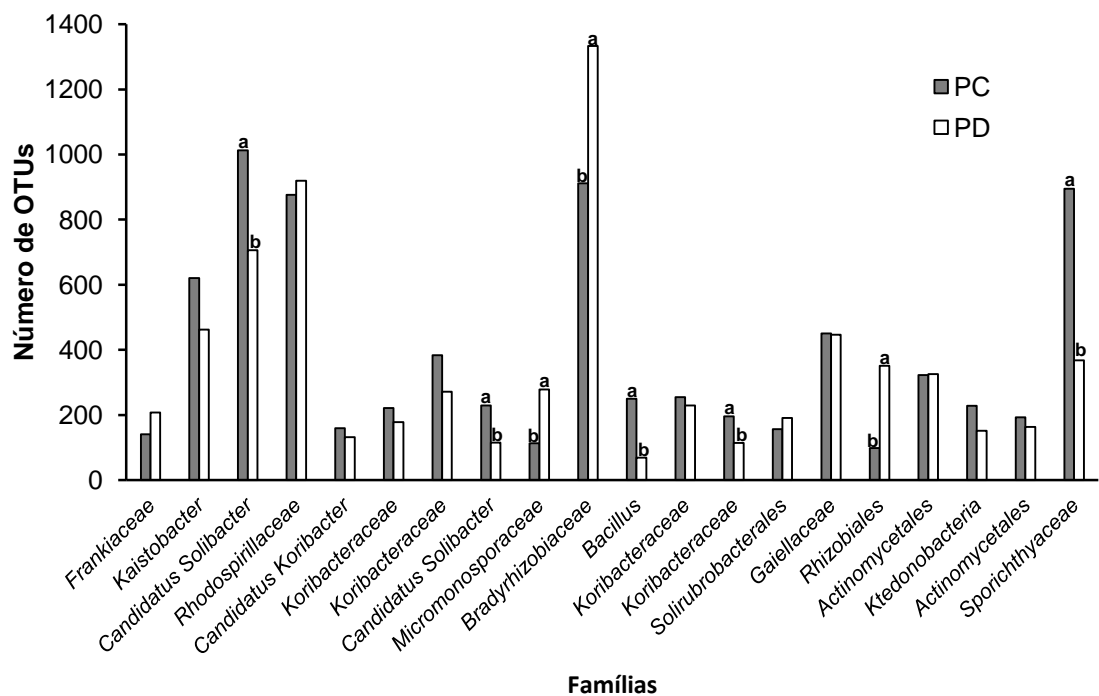


Figura 15. Número de unidades taxonômicas operacionais (OTUs) identificadas por sequenciamento de última geração, em amostras de um Argissolo submetido a diferentes sistemas de preparo de solo. Valores seguidos por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% (Sistemas: PC = preparo convencional e PD = plantio direto).

Quanto a presença de grupos bacterianos nos diferentes sistemas de culturas (Figura 16), também foi observado um grande número de OTUs classificados como *Bradyrhizobiaceae*, havendo a predominância dessa família nos sistemas A+V/M+C e V/M. O caupi é nodulado por *Bradyrhizobium* sp., o que explicaria o maior número de OTUs no sistema que contém esta leguminosa, entretanto este gênero estabelece simbiose com a vica, que por sua vez, é nodulada por *Rhizobium etli*. A análise da quantidade de OTUs na ordem Rhizobiales também demonstrou diferenças entre os sistemas de culturas, sendo que os sistemas que empregam leguminosas na sucessão apresentaram as maiores contagens.

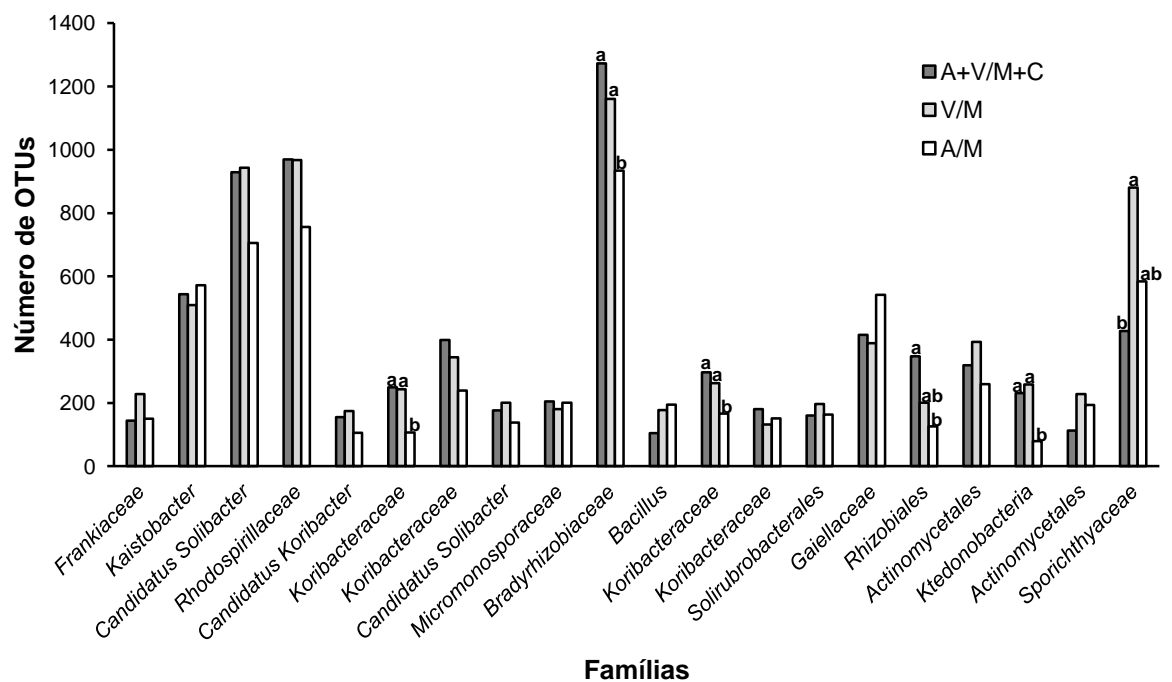


Figura 16. Número de unidades taxonômicas operacionais (OTUs) identificadas por sequenciamento de última geração, em amostras de um Argissolo submetido a diferentes sistemas de culturas. Valores seguidos por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% (A+V/M+C = aveia+vica/milho+caupi, V/M = vica/milho e A/M = aveia/milho).

O mesmo script também permitiu a visualização de diferentes níveis de classificação taxonômica. Na média geral, os filos dominantes foram

Actinobacteria (29,2%), Proteobacteria (29,2%) e Acidobacteria (12,5%). Além destes, merecem destaque Firmicutes (2,6%), Gemmatimonadetes (5,8%), Chloroflexi (4,2%), Bacteroidetes (1%) e Verrucomicrobia (0,6%). O restante compreende menos de 0,6% ou é classificado como domínio Bacteria, enquanto apenas 0,2% dos dados não puderam ser classificados. Estas proporções são semelhantes às observadas por Quadros et al. (2012), em pesquisa que trabalhou com amostras de solo oriundas do mesmo experimento do presente trabalho, além de empregar a mesma técnica de sequenciamento.

As Figuras 17 e 18 apresentam os gráficos ao nível de filo para preparo de solo e sistemas de culturas.

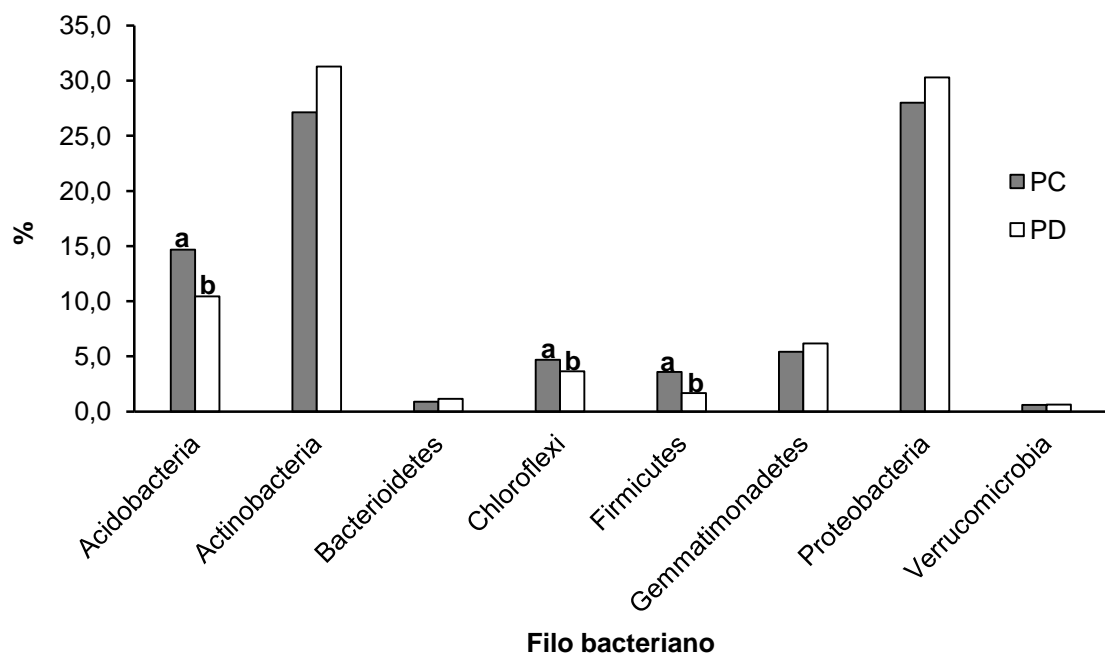


Figura 17. Proporção relativa de filios bacterianos em amostras de um Argissolo submetido a diferentes sistemas de preparo de solo. Valores seguidos por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% (PC = preparo convencional e PD = plantio direto).

Observando-se os gráficos, não há uma tendência clara de predomínio de um ou outro filo em decorrência de algum tratamento. Os filios Acidobacteria, Verrucomicrobia e Firmicutes foram afetados por interação entre

métodos de preparo de solo e sistemas de culturas, enquanto o filo Chloroflexi foi afetado apenas pelo modo de preparo e Proteobacteria foi afetado apenas pelo sistema de culturas. De um modo geral, o PC aumentou a dominância dos gêneros mais abundantes, enquanto os sistemas de cultura não apresentaram uma tendência tão clara.

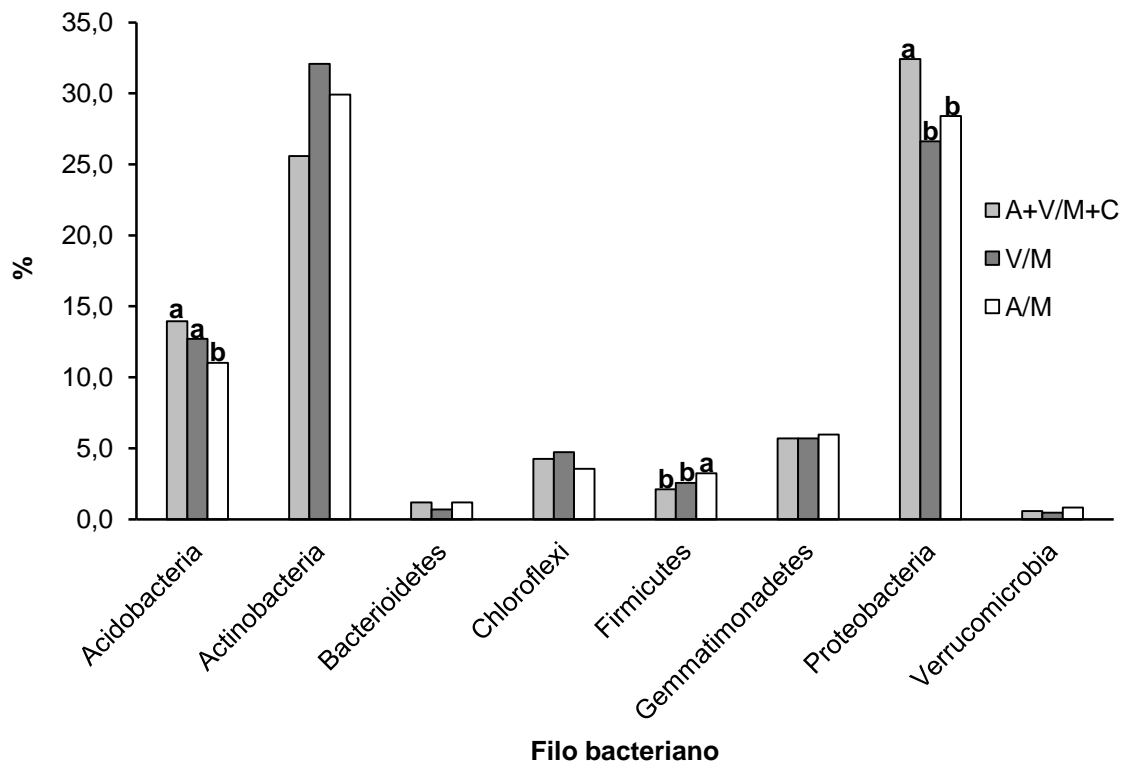


Figura 18. Proporção relativa de filamentos bacterianos em amostras de um Argissolo submetido a diferentes sistemas de culturas. Valores seguidos por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% (A+V/M+C = aveia+vica/milho+caupi, V/M = vica/milho e A/M = aveia/milho).

A análise de diversidade alfa (Tabela 4), com seus diferentes índices revelou uma similaridade entre as amostras estudadas. A análise de variância dos dados indicou o efeito de bloco, significativo para todos os índices estudados (Chao1, Shannon, Simpson, número de espécies observadas, dominância e equitabilidade). Embora os valores numéricos não tenham diferido muito, observou-se o efeito significativo de preparos de solo ou de

sistemas de culturas com relação ao índice de Simpson, à dominância e à equitabilidade (Tabela 3).

Tabela 3. Índices de diversidade alfa em um argissolo submetido a diferentes sistemas de manejo de solo.

Sistema de manejo	Índice de Simpson	Dominância	Equitabilidade
<b>Preparo de solo</b>			
<b>Preparo convencional</b>	0,997333 b	0,002667 a	0,850778 n.s.
<b>Plantio direto</b>	0,997889 a	0,002111 b	0,863000 n.s.
<b>Sistema de culturas</b>			
<b>Aveia/milho</b>	0,997500 b	0,001833 b	0,849000 b
<b>Vica/milho</b>	0,997167 b	0,002833 a	0,848333 b
<b>Aveia+vica/milho+caupi</b>	0,998167 a	0,002500 a	0,873333 a

Médias seguidas por letras diferentes nas colunas diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância. n.s.: não significativo.

O solo sob PD e o sistema de culturas A+V/M+C, que possuem os maiores teores de MO no solo e que tendem a aumentar a biomassa e a atividade microbiana, tiveram também maior diversidade bacteriana estimada pelo índice de Simpson. O sistema A+V/M+C também apresentou maior equitabilidade. O solo sob PC apresentou maior dominância de espécies em relação ao sob PD.

A estrutura das comunidades bacterianas também avaliada por meio de análises multivariadas, utilizando-se UniFrac, um método comum em metagenômica empregado para calcular a distância entre comunidades a partir de informação filogenética. Foi realizada a análise de componentes principais a qual revelou, novamente, um forte efeito do bloqueamento (Figura 17). As amostras do bloco 1 foram separadas pelo componente principal 1, ficando à direita das demais amostras. O efeito secundário observado foi devido aos métodos de preparo de solo, uma vez que o componente principal separou praticamente todas as amostras sob PC na parte inferior do diagrama e as sob PD na parte superior.



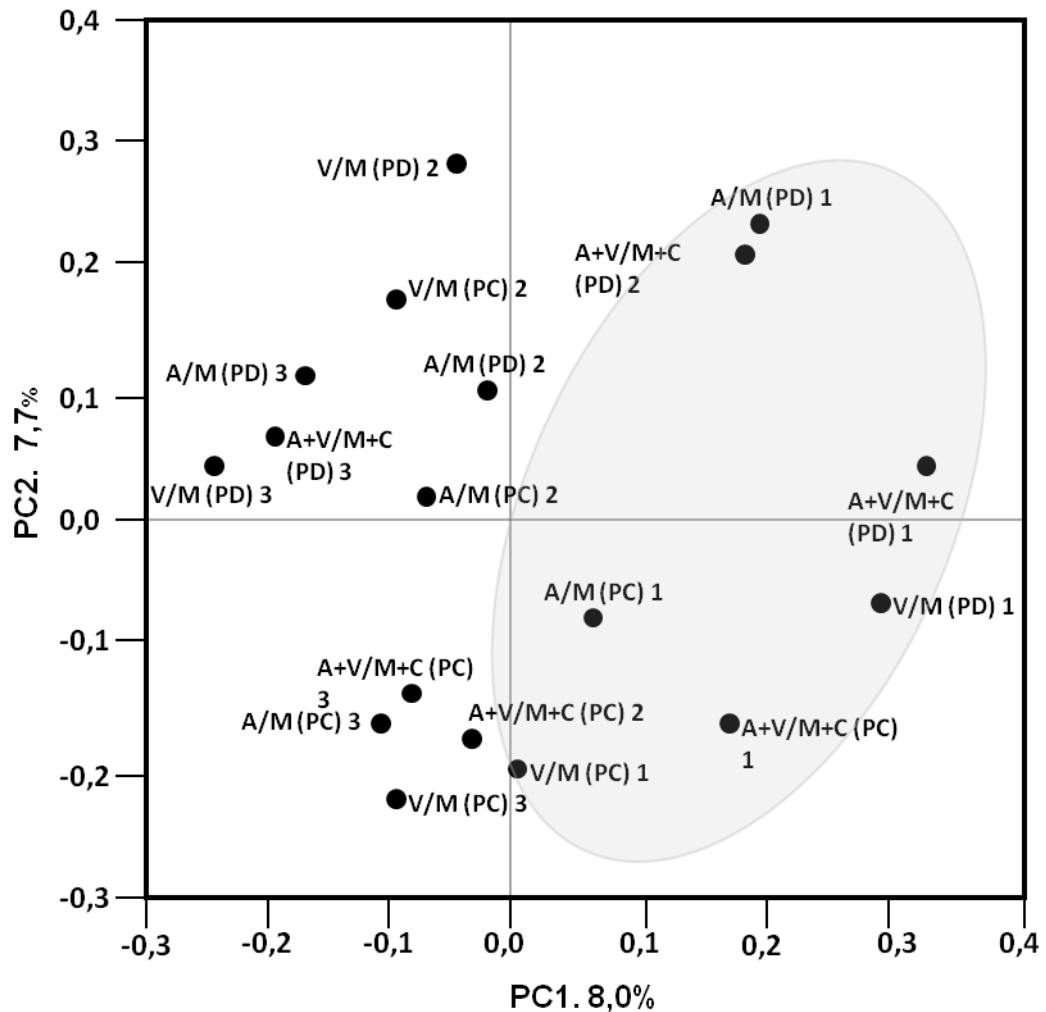


Figura 19. Análise de componentes principais da comunidade bacteriana de um argissolo submetido a diferentes sistemas de manejo de solo. (A+V/M+C = aveia+viça/milho+caupi, V/M = vica/milho, A/M = aveia/milho, PD = plantio direto e PC = preparo convencional).

Não há um efeito claro de sistemas de cultura sobre a comunidade microbiana. Assim como observado por Rachid et al. (2011), trabalhando com amostras de solo de Cerrado e de lavouras de cana-de-açúcar, a análise de ordenação demonstra que, apesar das medidas de diversidade alfa serem similares, as estruturas das comunidades bacterianas são distintas entre os tratamentos.

De modo a compreender melhor a estrutura das comunidades bacterianas, eliminando-se o efeito do bloqueamento, foi realizada uma análise multivariada de agrupamento, formando-se dendrogramas individuais para

cada bloco (Figura 18). Nos blocos 1 e 2, houve uma clara separação entre os métodos de preparo de solo, confirmando a informação obtida pela análise de componentes principais. Observou-se ainda uma tendência de agrupamento entre os tratamentos com presença de leguminosas, indo de encontro com o que foi observado na RISA. No bloco 3, houve um comportamento distinto, ficando mais acentuado o efeito dos sistemas de culturas, com a separação dos tratamentos com ou sem leguminosas, independentemente do método de preparo de solo.

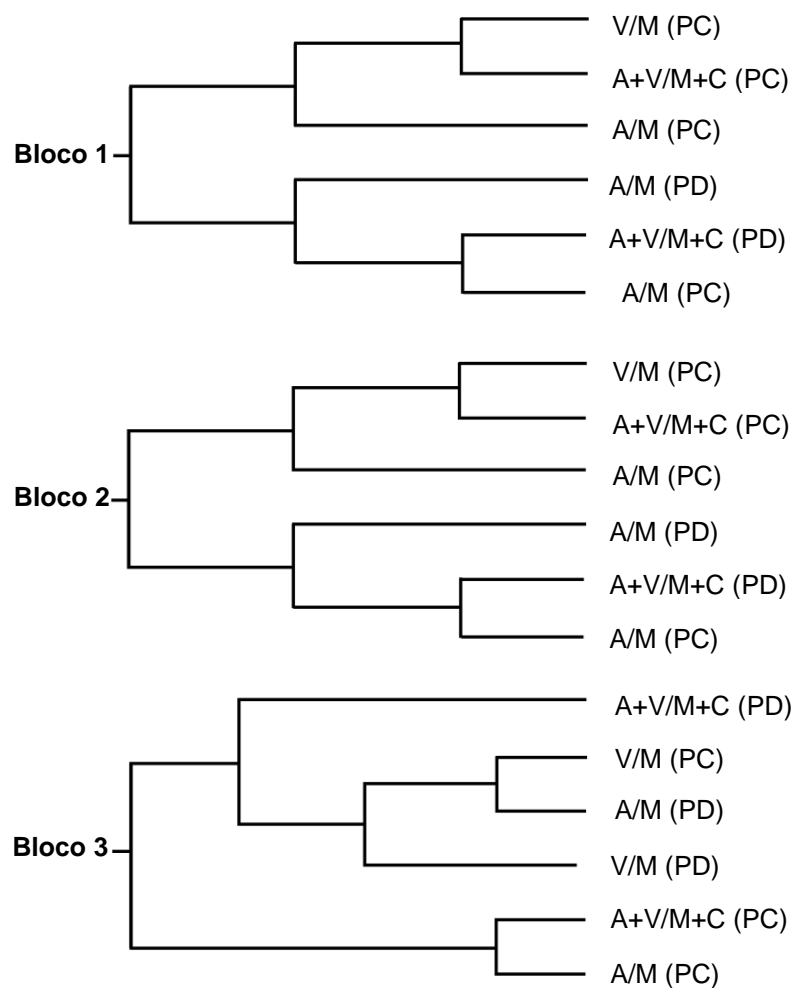


Figura 20. Análise de agrupamento da comunidade bacteriana de um Argissolo submetido a diferentes sistemas de manejo de solo nos blocos (Sistemas: A+V/M+C = aveia+vica/milho+caupi, V/M = vica/milho e A/M = aveia/milho).

Dessa forma, observa-se que há a influência dos sistemas de manejo (preparo de solo e sistemas de culturas) sob o perfil genético da

comunidade microbiana do solo, bem como sobre a supressividade do solo. Entretanto, não há uma clara predominância de grupos bacterianos específicos, o que pode estar indicando a ocorrência de um processo de supressividade do tipo geral.

## **5.4 Mecanismos de Ação**

### **5.4.1 Isolamento e Sequenciamento de Bactérias**

Foram isolados, de cada um dos tratamentos, 20 linhagens bacterianas a partir de diferenças morfológicas existentes entre as colônias, perfazendo, assim, um total de 120 isolados, os quais foram preservados em glicerol a -4 °C.

Conforme os resultados do teste de antagonismo, 33 isolados foram capazes de inibir o crescimento de *F. graminearum in vitro*. Por meio do sequenciamento do fragmento curto do 16S rRNA de cada isolado foram identificado oito gêneros bacterianos: *Burkholderia* (48%), *Bacillus* (18%), *Streptomyces* (12%), *Paenibacillus* (6%), *Rhizobium* (6%), *Pseudomonas* (3%), *Dyella* (3%) e *Mesorhizobium* (3%). Benítez et al. (2007) identificaram grupos bacterianos no solo ligados à supressividade a patógenos Oomicetos por meio de técnicas moleculares, nos quais estão presentes os gêneros observados no presente trabalho. De forma semelhante, Yin et al. (2012) observaram a maior frequência da ocorrência de bactérias do gênero *Mesorhizobium*, *Burkholderia* e *Dyella* na rizosfera de plantas saudáveis de trigo em experimento que avaliou a supressividade do solo a *R. solani*.

Não foi observado o predomínio de nenhum gênero em um determinado sistema de manejo. Dessa forma, pode-se concluir que, independentemente do sistema de manejo, há a ocorrência de bactérias com potencial antagonista no solo, sendo que a supressão propriamente dita se manifesta em função do tamanho e da atividade da comunidade microbiana do solo como um todo, caracterizando.

#### 5.4.1 Testes de Antibiose

Todos os 120 isolados foram testados quanto ao potencial antagonista *in vitro* contra *F. graminearum*, sendo identificado algum nível de inibição do crescimento do patógeno em 34 isolados (27,5%), conforme observado na Tabela 4. Por meio do teste estatístico, foi possível identificar pelo menos cinco isolados promissores para testes *in vivo* para avaliação do potencial destes como biocontroladores. Nota-se que nenhum destes isolados com maior poder antagonista é proveniente do tratamento A/M(PC), isto é, aquele que apresenta os menores valores de biomassa e atividade microbiana além dos menores potenciais supressivos, tanto nas avaliações *in vivo* quanto *in vitro*.

Dentre os isolados que demonstraram efeito fungistático, 45,4% destes foram provenientes das amostras de solo dos tratamentos conduzidos sob PD, enquanto 54,5% foram isolados daqueles sob PC. De forma semelhante, quando observado os sistemas de culturas, não houve diferenciação evidente entre os diferentes tratamentos: A+V/M+C (33%), V/M (27,3%) e A/M (39,4%). Estes dados não apresentam, portanto, uma relação entre o potencial antagonista dos isolados obtidos entre os diferentes sistemas de preparo e culturas e o potencial supressivo observado nos ensaios *in vivo* e *in vitro*. Estes resultados divergem dos obtidos por Adesina et al. (2007), os quais apresentaram uma proporção maior de isolados antagonistas de amostras provenientes de solos sabidamente mais supressivos.

Os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com a premissa de Baker e Cook (1974) de que potencialmente todo solo possui algum nível de supressividade, pois as amostras de todos os tratamentos avaliados, além de apresentarem potencial supressivo, também possibilitaram o isolamento de bactérias com propriedades fungistáticas, característica do processo geral de supressão (Weller et al., 2002; Mazzola, 2004). Portanto, é determinante para a intensidade do potencial supressivo, além da diversidade

de microrganismos no solo, também o tamanho e a atividade destas populações.

Tabela 4. Avaliação de potenciais mecanismos de ação de inibição de *F. graminearum* de isolados bacterianos oriundos de solo sobre diferentes sistemas de manejo de solo.

Isolado*	Gênero	halo de inibição (cm)	Inibição fusarium compostos voláteis (cm)	Produção de sideróforo
V/M (PC)-3	<i>Bacillus</i> sp.	1,30 a	3,25 b	+
A+V/M+C (PD)-14	<i>Burkholderia</i> sp.	1,20 a	2,88 b	+
V/M (PC)-4	<i>Streptomyces</i> sp.	1,00 a	3,25 b	-
A/M (PD)-14	<i>Burkholderia</i> sp.	0,97 a	3,45 b	+
A+V/M+C (PD)-9	<i>Bacillus</i> sp.	0,93 a	3,28 b	+
A+V/M+C (PD)-10	<i>Burkholderia</i> sp.	0,90 b	3,50 b	+
A+V/M+C (PD)-16	<i>Paenibacillus</i> sp.	0,87 b	1,37 a	+
V/M (PC)-5	<i>Bacillus</i> sp.	0,87 b	3,37 b	+
A/M (PD)-26	<i>Bacillus</i> sp.	0,83 b	3,62 b	+
A+V/M+C (PC)-12	<i>Burkholderia</i> sp.	0,83 b	3,21 b	+
V/M (PC)-10	<i>Rhizobium</i> sp.	0,80 b	4,10 b	+
V/M (PD)-22	<i>Rhizobium</i> sp.	0,80 b	3,25 b	+
A/M (PD)-24	<i>Burkholderia</i> sp.	0,77 b	3,12 b	+
A+V/M+C (PD)-23	<i>Streptomyces</i> sp.	0,67 b	2,00 a	-
A/M (PD)-22	<i>Burkholderia</i> sp.	0,67 b	2,87 b	+
A+V/M+C (PD)-17	<i>Pseudomonas</i> sp.	0,60 c	3,15 b	+
A/M (PC)-17	<i>Burkholderia</i> sp.	0,60 c	3,36 b	-
A+V/M+C (PC)-1	<i>Burkholderia</i> sp.	0,53 c	3,27 b	-
V/M (PD)-7	<i>Burkholderia</i> sp.	0,53 c	3,12 b	+
A/M (PC)-25	<i>Burkholderia</i> sp.	0,50 c	3,50 b	-
A/M (PC)-23	<i>Streptomyces</i> sp.	0,50 c	3,28 b	+
V/M (PD)-11	<i>Burkholderia</i> sp.	0,47 c	3,57 b	-
A+V/M+C (PC)-4	<i>Burkholderia</i> sp.	0,40 c	3,47 b	-
A/M (PC)-10	<i>Burkholderia</i> sp.	0,33 d	4,38 b	-
V/M (PD)-12	<i>Bacillus</i> sp.	0,33 d	3,25 b	+
A/M (PC)-10	<i>Streptomyces</i> sp.	0,33 d	3,55 b	-
A/M (PC)-21	<i>Dyella</i> sp.	0,27 d	3,74 b	-
A+V/M+C (PC)-26	<i>Bacillus</i> sp.	0,23 d	3,85 b	+
A+V/M+C (PC)-23	<i>Burkholderia</i> sp.	0,13 d	3,50 b	+
V/M (PD)-12	<i>Mesorhizobium</i> sp.	0,20 d	3,81 b	+
A+V/M+C (PC)-2	<i>Burkholderia</i> sp.	0,20 d	3,62 b	+
A/M (PC)-15	<i>Burkholderia</i> sp.	0,20 d	3,81 b	-
A+V/M+C (PC)- 23	<i>Paenibacillus</i> sp.	0,20 d	3,24 b	-
Testemunha		-	4,38 b	

Médias seguidas por letras distintas, minúsculas nas colunas diferem entre si, pelo teste de Sckott Knott, ao nível de significância de 5%. \* A+V/M+C = Aveia+Vica/Milho+Caupi, V/M = Vica/Milho e A/M= Aveia/Milho. PD= plantio direto e PC= preparo convencional.

Quanto à inibição de *F. graminearum* por meio de compostos voláteis, foram identificados apenas dois isolados que apresentaram essa capacidade IIPD16 (*Paenibacillus*) e IIPD23 (*Streptomyces*), como ilustrado na Figura 19. Observa-se que ambas as bactérias foram isoladas do tratamento sobre plantio direto que empregava o sistema de culturas A+V/M+C, isto é, o que apresentou os maiores níveis de supressividade (*in vitro* e *in vivo*), atividade e biomassa microbiana.

Trabalhos realizados por outros autores demonstraram que de 30 a 60% dos isolados bacterianos do solo eram capazes de produzir compostos voláteis inibidores de fungos (Zou et al., 2007), e que estes microrganismos possuíam um grande espectro filogenético, incluindo membros como *Bacillus*, *Micrococcus*, rizóbios e *Xanthomonas* (Kai et al., 2007; Zou et al., 2007), o que não foi observado no presente trabalho.



Figura 21. Mecanismos de ação dos isolados antagonistas: redução do crescimento micelial de *F. graminearum* em função da produção de compostos voláteis em relação à testemunha.

A capacidade inibitória de um determinado composto no solo vai depender, além de seu efeito bioquímico propriamente dito sobre o patógeno, também de sua capacidade de se difundir no meio (Hartmann et al., 2009). Tendo em vista a proporção, observada no presente trabalho, entre isolados bacterianos capazes de produzir antagonismo *in vitro* por meio compostos voláteis e não voláteis, é possível concluir que os compostos não voláteis são as substâncias antagonistas predominantes no controle de *F. graminearum*.

#### 5.4.2 Produção de Sideróforos

Sideróforos são moléculas quelatizantes de Fe, sintetizadas por diferentes bactérias do solo e são considerados como um fator de promoção de crescimento vegetal, pois além de aumentar a disponibilidade deste elemento para os vegetais, também o reduz para os fitopatógenos do solo (Glick, 1995). No presente trabalho foram encontrados, entre os isolados capazes de promover a fungistase *in vitro* de *F. graminearum*, bactérias produtoras de sideróforos (Figura 20). De forma semelhante De Boer et al. (2003) verificaram que o mecanismo que controlou murcha em rabanete causado por *F. oxysporum* foi a produção de sideróforo pelo isolado de *Pseudomonas putida* WCS358.

Do total de 33 isolados avaliados, 21 foram positivos para a produção de sideróforos (63,6%). Adesina et al. (2007) também observaram uma elevada proporção de isolados bacterianos que apresentaram a produção de sideróforos (83%) entre aqueles que demonstraram possuir atividade antagonistas a *F. oxysporum*. No presente trabalho, a maior parte desses isolados produtores de sideróforos pertence ao gênero *Burkholderia*, resultado também observado por Arruda et al. (2013) em estudo visando a seleção de bactérias promotoras de crescimento vegetal para a cultura do milho.

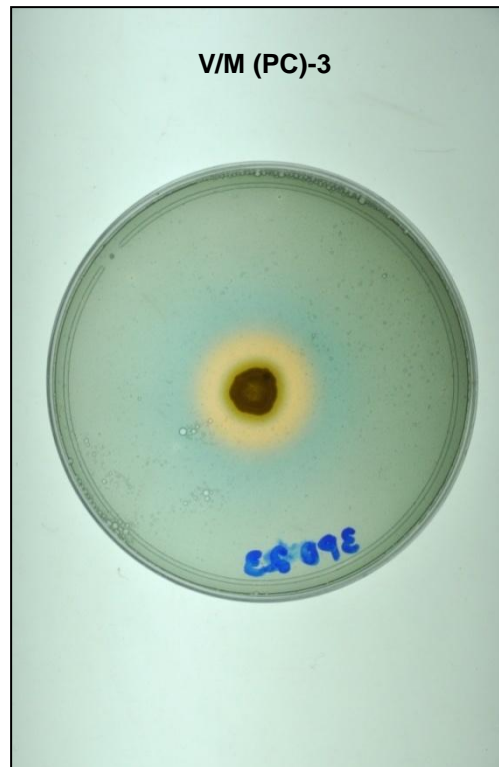


Figura 22. Mecanismos de ação dos isolados antagonistas: geração de halo em meio KB com cromo-azuroil, indicando a produção de sideróforos.

Observando os resultados obtidos no presente trabalho, percebe-se que dos dez isolados que apresentaram os melhores desempenhos no teste de antagonismo, apenas um isolado não apresentou capacidade para produção de sideróforos, e por outro lado, dos dez isolados com menor atividade antagonista, apenas a metade deles produziram sideróforos. A capacidade de produzir sideróforos é considerada um dos principais mecanismos de ação para a supressão de fitopatógenos, sendo que seu princípio é a vantagem competitiva que possuem organismos produtores destas moléculas pela competição por ferro disponível (Arora et al., 2001).

Pode-se concluir que a produção de sideróforos apresentada pelos isolados que também apresentaram poder antagonista a *F. graminearum* (vinte e um isolados) no presente trabalho é um segundo mecanismo de ação, tendo em vista que a inibição do patógeno observada *in vitro* não foi resultante da atividade dos sideróforos, pois o meio de cultura empregado naquele teste fornece Fe disponível para o desenvolvimento normal do fungo patogênico, e



portanto, a presença do sideróforo não possui efetividade biocontroladora. De forma semelhante à observada na avaliação *in vitro* de fungistase, não foi identificada uma relação entre os sistemas de preparo e os isolados produtores de sideróforos.

## 6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos e considerando as condições em que o experimento foi conduzido, pode-se concluir que:

- A supressão do solo a doença de plantas é influenciada pelo sistema de manejo do solo e é gerada pela atividade e biomassa microbiana geral do solo.

- Os sistemas de manejo que favorecem o aumento do teor de MO no solo, e, por consequência, incrementam a diversidade, biomassa e atividade microbiana do solo, são os que apresentam o maior poder supressivo à podridão do trigo causada por *F. graminearum*.

- O solo sob PD apresenta maior potencial supressivo quando comparado com PC.

- De maneira geral, a inclusão de leguminosas no sistema de cultura aumentou o potencial supressivo do solo.

## 7. REFERÊNCIAS

- ADESINA, M. F. et al. Screening of bacterial isolates from various European soils for in vitro antagonistic activity towards *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum*: site-dependent composition and diversity revealed. **Soil Biology e Biochemistry**, Elmsford, v. 39, n.11, p. 2818-2828, 2007.
- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5. ed. Amsterdam: Elsevier, 2004. 922 p.
- ALABOUVETTE, C. Fusarium wilt suppressive soils: an example of disease-suppressive soils. **Australasian Plant Pathology**, Toowoomba East, v. 28, n.1, p. 57-64, 1999.
- ALBUQUERQUE, J. A. et al. Rotação de culturas e sistemas de manejo do solo: efeito sobre a forma da estrutura do solo ao final de sete anos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 19, n.1, p. 115-119, 1995.
- ALEF, K.; NANNIPIERI, P. **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. London: Academic Press, 1995. 576 p.
- ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G. Produção, determinação e calibração da concentração de inoculo em suspensão In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. (Ed.). **Métodos em fitopatologia**. Viçosa: UFV, 2007. p. 101-116.
- ALVAREZ, R. Soil organic carbon, microbial biomass and CO<sub>2</sub>-C production from tree tillage systems. **Soil e Tillage Research**, New York, v. 33, n.1, p. 17-28, 1995.
- ANDREWS, S. C.; ROBINSON, A. K.; RODRIGUEZ-QUINONES, F. Bacterial iron homeostasis. **FEMS Microbiological Review**, Amsterdam, v. 27, n. 2, p. 215-237, 2003.
- ANGLY, F. E. et al. The marine viromes of four oceanic regions. **PLOS Biology**, Basel, v. 4, n. 11, p. 2121–2131, 2006.
- ARORA, N. K.; KANG, S. C.; MAHESHWARI, D. K. Isolation of siderophore-producing strains of *Rhizobium meliloti* and their biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina* that causes charcoal rot of groundnut. **Current Science**, Bangalore, v. 81, n. 6, p. 673-677, 2001.

ARRUDA, I. et al. Screening of rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) in Rio Grande do Sul State (South Brazil) and analysis of their potential to improve plant growth. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 63, p. 15– 22, 2013.

AVIDANO, L. et al. Characterization of soil health in a Italian polluted site by using microorganisms as bioindicators. **Applied soil ecology**, Amsterdam, v. 30, p. 21-33, 2005.

BALOTA, E. L. et al. Long-term tillage and crop rotation effects on microbial biomass and C and N mineralization in a Brazilian Oxisol. **Soil e Tillage Research**, New York, v. 77, p. 137-145, 2004.

BANDICK, A. K.; DICK, R. P. Field management effects on soil enzyme activities. **Soil Biology e Biochemistry**, Elmsford, v. 31, n. 11, p. 1471-1479, 1999.

BASTOS, A. C.; MAGAN, N. Soil volatile fingerprints: use for discrimination between soil types under different environmental conditions. **Sensors and Actuators B**, Lausanne, v. 125, n. 2, p. 556–562, 2007.

BAKER, K. F.; COOK, R. J. **Biological Control of Plant Pathogens**. San Francisco: WH Freeman, 1974, 433 p.

BABUJIA, L. C. et al. Microbial biomass and activity at various soils depths in a Brazilian oxisol after two decades of no tillage and conventional tillage. **Soil Biology e Biochemistry**, Elmsford, v. 42, n. 3, p. 2174-2181, 2010.

BAILEY, K.; LAZAROVITS, G. Suppressing soil-borne diseases with residue management and organic amendments. **Soil e Tillage Research**, New York, v. 72, n. 2, p. 169–180, 2003.

BALDRIAN, P. et al. Enzyme activities and microbial biomass in topsoil layer during spontaneous succession in spoil heaps after brown coal mining. **Soil Biology e Biochemistry**, Elmsford, v. 40, n. 9, p. 2107–2115, 2008.

BAYER, C.; MIELNICZUK, J. Características químicas do solo afetadas por métodos de preparo e sistemas de cultura. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 21, n. 2, p. 235-239, 1997.

BENEDUZI, A. et al. Evaluation of genetic diversity and PGPR activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 39, p. 311-320, 2008.

BENÍTEZ, M. et al. Multiple statistical approaches of community fingerprint data reveal bacterial populations associated with general disease suppression arising from the application of different organic field management strategies. **Soil Biology e Biochemistry**, Elmsford, v. 39, n. 9, p. 2289–2301, 2007.

BONANOMI, G. et al. Suppression of soilborne fungal diseases with organic amendments. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 89, p. 311–24, 2007.

BONANOMI, G. et al. Identifying the characteristics of organic soil amendments that suppress soil borne plant diseases. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 42, n. 1, p. 36–44, 2010.

BOTELHO, G. R. et al. **A importância dos antibióticos produzidos por *Pseudomonas fluorescentes* na supressão de doenças de plantas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2006. 31p.

BRAUN, V. et al. Bacterial iron transport: mechanisms, genetics, and regulation. **Metal Ions in Biological Systems**, New York, v. 35, p. 67-145, 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Atlas climatológico do Brasil**. Rio de Janeiro:[s.n], 1969. 100 p.

CAMPOS, S. B. et al. Changes in root bacterial communities associated to two different development stages of canola (*Brassica napus* L. var *oleifera*) evaluated through next-generation sequencing technology. **Microbial Ecology**, New York, v. 65, n. 3, p. 593, 2013.

CAPORASO J. G. et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proceedings of the National Academy of sciences of United States**, Stanford, v. , n. 10, p. 4516–4522, 2010.

CARTER, M. R. Microbial biomass as index for tillage-induced changes in soil biological properties. **Soil and Tillage Research**, New York, v. 7, n. 1, p. 29-40, 1986.

CARTER, M. R. The influence of tillage on the proportion of organic carbon and nitrogen in the microbial biomass of médium-textured soils in a humid climate. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 11, n. 2, p. 135-139, 1991.

CATTELAN, A. J.; VIDOR, C. Flutuações na biomassa, atividade e população microbiana do solo em função de variações ambientais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 14, n. 2, p.133-142, 1990.

CEJA-NAVARRO, J. A. et al. Molecular characterization of soil bacterial communities in contrasting zero tillage systems. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 329, n. 1, p. 127-137, 2010.

COLLARES, G. L. et al. Qualidade física do solo na produtividade da cultura do feijoeiro num Argissolo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 11, p. 1663-1674, 2006.

COOK, R. J; BAKER, K. F. **The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens**. Saint Paul: APS, 1983, p. 539

DE BOER, M. et al. Control of *Fusarium* wilt radish by combining *Pseudomonas putida* strains that have different disease-suppressive mechanisms. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, p. 626-632, 2003.

DE BOER W. et al. *In vitro* suppression of fungi caused by combinations of apparently non-antagonistic soil bacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 59, n. 2, p. 177–185, 2007.

DERPSCH, R. et al. Current status of no-till farming in the world and some of its main benefits. **International journal of Agricultural e Biological Engineering**, Beijing, v. 3, n. 1, p.1-25, 2010.

DOBBS, C. G.; HINSON, W. H. A widespread fungistasis in soils. **Nature**, London, v. 172, p. 197-199, 1953.

DORAN, J. W. Soil quality and sustainability. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 26., 1997, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro:SBCS, 1997. CD-ROM.

EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília: Embrapa, 2006. 306 p.

FARINA, R. et al. Diversity of plant growth-promoting rhizobacteria communities associated with the stages of canola growth. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 55, p. 44-52, 2012.

FEBRAPDP. Federação brasileira de plantio direto na palha. Disponível em: <<http://www.febrapdp.org.br/download/BREvolucaoPD2002a2006.pdf>>. Acesso em: 10 maio 2012

FELSKE, A. et al. Searching of predominant soil bacteria 16S rDNA cloning *versus* strain cultivation. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 30, n. 8, p. 37-45, 1999.

FIGUEIREDO, M. V. B. et al. Bactérias promotoras do crescimento de plantas: estratégia para uma agricultura sustentável. In: FIGUEIREDO, M. V. B. (Org.) et al. . **Biotecnologia aplicada a agricultura: textos de apoio e protocolos experimentais**. Brasília: EMBRAPA, 2010. p. 387-414.

FISHER, M. M.; TRIPLET, E. W. Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 10, p. 4630-4636, 1999.

GARBEVA, P. et al. Fungistasis and general soil biostasis - a new synthesis. **Soil Biology e Biochemistry**, Elmsford, v. 43, n. 3, p. 469-477, 2011.

GARBEVA, P. et al. Effect of above-ground plant species on soil microbial community structure and its impact on suppression of *Rhizoctonia solani* AG3. **Environmental Microbiology**, [S.l.], v. 8, n. 2, p. 233-246, 2006.

GHINI, R.; ZARONI, M. M. H. Relação entre coberturas vegetais e supressividade de solos a *Rhizoctonia solani*. **Fitopatologia Brasileira**, Cidade, v. 26, n. 1, p.10-15, 2001.

GLICK, B. R. The enhancement of plant growth by free living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 41, n. 2, p. 109–117, 1995.

HADAR, Y.; PAPADOPOULOU, K. K. Suppressive compost: microbial ecology links between abiotic environments and healthy plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 50, p. 133-153, 2012.

HARTMANN, A. et al. Plant-driven selection of microbes. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 321, n. 1, p. 235-257, 2009.

HOITINK, H. A. J., BOEHM M. J. Biocontrol within the context of soil microbial communities: a substrate-dependent phenomenon. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, n. 1, p. 427-446, 1999.

HORWATH, et al. Defining a realistic control for the chloroform fumigation-incubation method using microscopic counting and <sup>14</sup>C-substrates. **Canadian Journal of Soil Science**, Ottawa, v. 76, n. 4, p. 459-467, 1996.

INSAM, H.; SEEWALD, M. S. A. Volatile organic compounds (VOCs) in soils. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 46, n. 3, p.199–213, 2010.

JANTALIA, C. P. et al. Mudanças no estoque de C do solo em áreas de produção de grãos: avaliação do impacto do manejo de solo. In: ALVES, B. J. R.(Ed.) et al. **Manejo de sistemas agrícolas: impacto no sequestro de C e nas emissões de gases de efeito estufa**. Porto Alegre: Genesis, 2006. p. 35-58.

JANVIER, C. et al. Soil health through soil disease suppression: Which strategy from descriptors to indicators? **Soil Biology e Biochemistry**, Elmsford, v. 39, n. 1, p.1–23, 2007.

JENKINSON, D. S. Studies on the decomposition of plant material in soil II. Partial sterilization of soil and the soil biomass. **Journal of Soil Science**, London, v. 17, n. 2, p. 280-302, 1966.

JENKINSON, D. S.; POWLSON, D. S. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil – V. A method for measuring soil biomass. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 8, n. 3, p. 209-213, 1976.

KAI, M. et al. Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. **Archives of Microbiology**, [S.l.], v.187, n. 4, p. 351–360, 2007.

KINKEL, L. L.; BAKKER, M. G; SCHLATTER, D. C. A coevolutionary framework for managing disease-suppressive soils. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 49, p. 47–67, 2011.

KIRK, J. L. et al. Methods of studying soil microbial diversity, **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 58, n. 2, p.169-188, 2004.

KLOEPPER, J. W. et al. *Pseudomonas* siderophores: a mechanism explaining disease-suppressive soils. **Current Microbiology**, New York, v. 4, n. 5, p. 317-320, 1980.

KNUDSEN, I. M. B. et al. Suppressiveness of organically and conventionally managed soils towards brown foot rot of barley. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v.12, n. 1, p. 61-72, 1999.

KURLE, J. E. et al. Tillage, crop sequence and cultivar effects on Sclerotinia stem rot incidence and yield in soybean. **Agronomy Journal**, Madison, v. 93, n. 5, p. 973–982, 2001.

LACAVALA, P. A. et al. Detection of siderophores in endophytic bacteria *Methylobacterium* spp. associated with *Xylella fastidiosa* sub sp. pauca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 4, p. 521-528, 2008.

LAMBERS, H. et al. Plant-microbe- soil interactions in the rhizosphere: an evolutionary perspective. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 321, n. 1, p. 83-115, 2009.

LAZAREVIC, V. et al. Metagenomic study of the oral microbiota by Illumina high-throughput sequencing. **Journal of Microbiology Methods**, Amsterdam, v. 79, n. 3, p. 266-71, 2009.

LEE, J. J.; PHILLIPS, D. L.; LIU, R. The effect of trends in tillage practices on erosion and carbon content of soils in the US corn belt. **Water, Air, and Soil Pollution**, Amsterdam, v. 70, n. 4, p. 389-401, 1993.

LISBOA, B. B. et al. Indicadores microbiológicos de qualidade do solo em diferentes sistemas de manejo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 36, n. 1, p. 45-55, 2012.

LIU, Z. et al. Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 35, n. 18, p. 120, 2007.

LORITO, M. et al. Purification, characterization, and synergistic activity of a glucan 1,3- $\beta$ -glucosidase and an N-acetyl-b-glicosaminidase from *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 84, p. 398-405, 1994.

LUTZ, M. P. et al. Signaling between bacterial and fungal biocontrol agents in a strain mixture. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 48, n. 3, p. 447–455, 2004.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2<sup>nd</sup> edition. London: Academic Press. 1995.

MARTIN, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. Technical Notes, **EMBnet.journal**, Disponível em: <<http://www.journal.embnet.org/index.php/embnetjournal/article/view/200/479fe-brapdp.org.br/download/BREvolucaoPD2002a2006.pdf>>. Acesso em: 25 de outubro de 2013



MAURHOFER, M. et al. Cross talk between 2,4-Diacetylphloroglucinol – producing biocontrol pseudomonads on wheat roots. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 4, p. 1990-1998, 2004.

MAZZOLA, M.; GU, Y. H. Wheat genotype-specific induction of soil microbial communities suppressive to *Rhizoctonia solani* AG 5 and AG 8. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 92, p.1300–1307, 2002.

MAZZOLA, M. Assentement and Management of soil microbial community structure for disease suppression. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 42, p. 35-59, 2004.

MEYER, J. B. et al. Interplay between wheat cultivars, biocontrol *pseudomonas*, and soil. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 18, p. 6196-6204, 2010.

MIELNICZUK, J. et al. Manejo de solo e culturas e sua relação com estoques de carbono e nitrogênio do solo. In: CURI, N. et al. **Tópicos em ciência do solo**, Viçosa: SBCS, 2003 v. 3, p.209-248.

MIJANGOS, I. et al. Effects of fertilization and tillage on soil biological parameters. **Enzyme and Microbial Technology**, Amsterdam, v. 40, n. 1, p. 100-106, 2006.

MONDAL, S. N.; HYAKUMACHI, M. Carbon loss and germinability, viability, and virulence of chlamydospores of *Fusarium solani* f. sp. *Phaseoli* after exposure to soil at different pH levels, temperatures, and matric potentials. **Phytopathology**, Saint Paul, v.88, p.148-155, 1998.

NIEDRINGHAUS, T. P. et al. Landscape of next-generation sequencing technologies. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 83, n. 12, p. 4327-4341, 2011.

PANKHURST, C. E. et al. Effect of tillage and stubble management on chemical and microbiological properties and the development of suppression towards cereal root disease in soils from two sites in NSW, Australia. **Soil Biology e Biochemistry**, Elmsford, v. 34, n. 6, p. 833–840, 2002.

PARHAM, J. A.; DENG, S. P. Detection, quantification and characterization of b-glicosaminidase activity in soil. **Soil Biology e Biochemistry**, Elmsford, v. 32, n. 5, p. 1183-1190, 2000.

PEREZ-BRANDÁN, C. et al. Long-term effect of tillage systems on soil microbiological, chemical and physical parameters and the incidence of charcoal rot by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid in soybean. **Crop Protection**, Guildford, v. 40, p. 73-82, 2012.

PERNEEL, M. et al. Phenazines and biosurfactants interact in the biological control of soil-borne diseases caused by *Pythium* spp. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 10, n. 3, p. 778–788, 2008.

PETERS, R. D.; STURZ, A. V.; CARTER, M. R. SANDERSON, J. B. developing disease-suppressive soils through crop rotation and tillage management practices. **Soil e Tillage research**, New York, v. 72, p. 181-192, 2003.

NITTA, T. Diversity of root fungal floras: Its implications for soil-borne diseases and crop growth. **Japan Agricultural Research**, Tokyo, v. 25, n. 1, p. 6–11, 1991.

POSTMA, J. et al. Soil suppressiveness and functional diversity of the soil microflora in organic farming systems. **Soil Biology e Biochemistry**, Elmsford, v. 40, n. 2, p. 2394-2406, 2008.

PROSSER, J. I. Molecular and functional diversity in soil microorganisms. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 244, n. 1, p. 9-17, 2002.

QUADROS, P. D. et al. The effect of tillage system and crop rotation on soil microbial diversity and composition in a subtropical Acrisol. **Diversity**, Bethesda, v. 4, n. 4, p. 375-395, 2012.

RAAIJMAKERS, J. M.; WELLER, D. M.; THOMASHOW, L. S. Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 3, p. 881-887, 1997.

RAAIJMAKERS, J. M.; WELLER, D. M. Natural plant protection by 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* spp. in take-all decline soils. **Molecular and Plant–Microbial Interaction**, Saint Paul, v.11, n. 2, p. 144–152, 1998.

RACHID, C. T. C. C. et al. Impacto da cana na comunidade de desnitrificantes, fluxo de N<sub>2</sub>O e potencial de desnitrificação do solo de cerrado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 26., 2011, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: SBM, 2011.

RANJARD, L. et al. Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints: biological and methodological variability. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 10, p. 4479-4487, 2001.

RASMUSSEN, P. H. et al. Relationship between soil cellulolytic activity and suppression of seedling blight of barley in arable soils. **Applied Soil e Ecology**, Amsterdam, v. 19, n. 1, p. 91–96, 2002.

RIMÉ, D. et al. Comparison of sandy soils suppressive or conducive to ectoparasitic nematode damage on sugarcane. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, p. 1437–1444, 2003.

RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; CANULLO, G. H. Cropping systems for the management of phytonematodes. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 20, n. 3, p. 211-224, 1992.

ROLDÁN, A. et al. No-tillage, crop residue additions, and legume cover cropping effects on soil quality characteristics under maize in Patzcuaro watershed (Mexico). **Soil and Tillage research**, New York, v. 72, n. 1, p. 65-73, 2003.

ROLDÁN, A. et al. Soil sustainability indicators following conservation tillage practices under Subtropical maize and bean crops. **Soil and Tillage Research**, New York, v. 93, n. 2, p. 273–282, 2007.

ROMEIRO, R. S. **Controle biológico de enfermidades de plantas – fundamentos**. Editora UFV: Viçosa, MG, 2007. p. 269.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning**: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Nova York, 2001. p. 2344

SCHIPPERS, B. Prospects for management of natural suppressiveness to control soilborne pathogens. In: TJAMOS, E.C.(Ed.) et al., **Biological control of plants diseases**: progress and challenges for the future. New York: Plenum Press, 1992. p. 21-34.

SCHWYN, B.; NEILANDS J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, Washington, v.160, n. 1, p. 47-56, 1987.

SHIOMI, H. F.; MELO, I. S.; MINHONI, M. T. A. Seleção de bactérias endofíticas com ação antagonicas a fitopatógenos. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 9, n. 4, p. 535-538, 2008.

SIDDIQUI, Z. A. PGPR: prospective biocontrol agents of plant pathogens. In: SIDDIQUI Z. A. (Ed.) **PGPR: biocontrol and biofertilization**. Dordrecht: Springer, 2005. p.111–142.

SIDDIQUI, I. A.; SHAUKAT, S. S.; HAMID, M. Combined application of endophytic *Fusarium solani* and *Pseudomonas aeruginosa* for the suppression of *Meloidogyne javanica* in tomato. **Phytopathologia Mediterranea**, Bologna, v. 41, n. 2, p. 138-147, 2002.

SILVA, F.; AZEVEDO, C. A. V. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 4, n. 1, p. 71-78, 2002.

SIPILÄ, T. P. et al. Cross-site soil Microbial communities under tillage regimes: fungistasis and microbial biomarkers. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, n. 23, p. 8191–8201, 2012.

SOANE, B. D. et al. No-till in northern, western and south-western Europe: A review of problems and opportunities for crop production and the environment. **Soil e Tillage Research**, New York, v. 118, n. 1, p. 66–87, 2012.

SOARES, R. A. et al. Occurrence and distribution of nitrogen fixing bacterial community associated with oat (*Avena sativa*) assessed by molecular and

microbiological techniques. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 33, n. 3, p. 221-234, 2006.

SOLANO, B. R. et al. Physiological and molecular mechanisms of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). In: AHMAD, I. et al. (Ed). **Plant-bacteria interactions**. Weinheim: Wileyvch, 2008. p. 41-52.

STURZ, A. V.; CARTER, M. R.; JOHNSTON, H. W. A review of plant disease, pathogen interactions and microbial antagonism under conservation tillage in temperate humid agriculture. **Soil and Tillage Research**, New York, v. 41, n. 3, p. 169–189, 1997.

TIEDJE, J. M. et al. Opening the black box of soli microbial diversity. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 13, n. 2, p.109-122, 1999.

TERMORSHUIZEN, A. J. et al. Suppressiveness of 18 composts against 7 pathosystems: variability in pathogen response. **Soil Biology e Biochemistry**, Elmsford, v. 38, n. 2, p. 2461-2477, 2006.

TERMORSHUIZEN, A. J.; JEGER, M. J. Strategies of soilborne plant pathogenic fungi in relation to disease suppression. **Fungal Ecology**, Manchester, v. 1, n. 4, p. 108–114, 2008.

TOPP, E. Bacteria in agricultural soils: diversity, role and future perspectives. **Canadian Journal of Soil Science**, Ottawa, v. 83, n. 3, p. 303–309, 2003.

TORSVIK, V.; GOKSORY, J.; DAAE, F. L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied Soil e Ecology**, Amsterdam, v. 56, n. , p. 782-787, 1990.

VAN BRUGGEN, A. H. C.; SEMENOV, A. M. In search of biological indicators for soil health and disease suppression. **Applied Soil e Ecology**, Amsterdam, v.15, n. 1, p.13–24, 2000.

VARGAS, L. K.; SHOLLES, D. Biomassa microbiana e produção de C-CO<sub>2</sub> e N mineral de um Podzólico Vermelho Escuro submetido a diferentes sistemas de manejo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 24, n. 1, p. 35-42, 2000.

VERCHOT, L. V.; BORELLI, T. Application of para-nitrophenol (pNP) enzyme assays in degraded tropical soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 37, n. 3, p. 625–633. 2005.

XU, C. et al. Soil volatile fungistasis and volatile fungistatic compounds. **Soil Biology e Biochemistry**, Elmsford, v.36, n. 12, p. 1997–2004, 2004.

ZHAO, Z. et al. Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 in vitro and identification of its antifungal components. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 1, p. 292–297, 2010.

ZOU, C. S. et al. Possible contributions of volatile-producing bacteria to soil fungistasis. **Soil Biology e Biochemistry**, Elmsford, v. 39, n. 9, p. 2371–2379, 2007.

YIN, C.; HULBERT, S.H.; SCHROEDER, K.L.; MAVRODI, O.; MAVRODI, D.; DHINGRA, A.; SCHILLINGER, W.F. e PAULIT, T.C. The role of bacterial communities in the natural suppression of *Rhizoctonia* bare patch of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Applied Environment Microbiology*, doi: 10.1128/AEM.02202-13, 2013.

YOUNGSEOB, Y. et al. Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 89, n. 6, p. 670-679, 2005.

WANG, Y. et al. Long-term impact of farming practices on soil organic carbon and nitrogen pools and microbial biomass activity. **Soil e Tillage Research**, New York, v. 117, n. 1, p. 8-16, 2011.

WAKELIN, S. A. et al. Pasture management clearly affects soil microbial community structure and N-cycling bacteria. **Pedobiologia**, Jena, v. 52, n. 4, p. 237–251, 2009.

WARD, N. L. et al. Three genomes from the phylum Acidobacteria provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 7, p. 2046-2056, 2009.

WELLER, M. et al. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 309-348, 2002.

WENKE, K.; KAI, M.; PIECHULLA, B. Belowground volatiles facilitate interactions between plant roots and soil organisms. **Planta**, Berlin, v. 231, n. 3, p. 499–506, 2010.

WHIPPS, J. M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, n. 355, p. 487-511, 2001.

WIDMER, F. et al. Analysis of *nifH* gene pool 585 complexity in soil and litter at a Douglas Fir Forest site in the Oregon Cascade 586 Mountain Range. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 2, p. 374-380, 1999.

WIELAND, G.; NEUMANN, R.; BACKHAUS, H. Variation of microbial communities in soil, rhizosphere, and rhizoplane in response to crop species, soil type, and crop development. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 12, p. 5849-5854, 2001.

WU, T. et al. Discriminating the effects of agricultural land management practices on soil fungal communities. **Soil Biology e Biochemistry**, Elmsford, v. 39, n. 5, p. 1139–1155, 2007.

## 8. APÉNDICES

#### APÊNDICE 01.

**Meio de cultura SNA:** Em 1L de água destilada foram adicionados, 01g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,0g de  $\text{KNO}_3$ , 0,5g de  $\text{MgSO}_4$ , 0,5g de  $\text{KCl}$ , 0,2g de glicose, 0,2g de sacarose e 20g de Agar.

#### APÊNDICE 02.

**Tampão universal modificado (MUB), pH 6:** O preparo do tampão foi realizado a partir da produção de uma solução estoque de **tampão universal modificado (MUB)** o qual era preparado através da dissolução de 12,1g de tris (THAM), 11,6g de ácido maleico, 14,0g de ácido cítrico e 6,3g de ácido bórico em 488ml de hidróxido de sódio 1M e posteriormente diluída a solução para 1 L com água e acondicionado sob refrigeração. Para o preparo do tampão MUB a pH 6,0, foi colocado 200 mL de solução estoque de MUB em um becker de 500mL contendo agitador magnético. A solução foi titulada a pH 6,0 com ácido clorídrico 1M, e posteriormente transferida para um frasco volumétrico de 1L e ajustado o volume para 1 L com água.

#### APÊNDICE 03.

**Solução de p-nitrofenol- $\beta$ -D-glucosidase 0,05M (NAG):** Dissolver 0,342 g de p-nitrophenyl-N-acetyl-b-D-glucosaminidine (N-9376, Sigma Chemicals, St. Louis, MO.) em 100 mL de tampão acetato (0.1 M, pH 5.5). A solução deve ser armazenada a 4°C.

## APÊNDICE 04.

**Solução Padrão de p-nitrofenol:** Era procedida a dissolução de 1,0 g de p-nitrofenol em cerca de 700 mL de água e em seguida a solução foi diluída para 1 L com água. A solução era mantida sob refrigeração.

## APÊNDICE 05.

Meio de cultura para isolamento de bactérias do solo (**Meio Thornton**): Para o preparo de meio foram adicionados em 1L de água destilada 1,0g de  $K_2HPO_4$ , 0,2g de  $MgSO_4$ , 0,1 g  $CaCl_2$ , 0,1g de NaCl, traços de  $FeCl_3$ , 0,5g de  $KNO_3$ , 0,5g de asparagina, 1,0g de manitol, 15g de agar. O pH foi ajustado para 7,4 com HCl antes da adição do agar.

## APÊNDICE 06.

**Meio LM:** Em 1L de água destilada foram adicionados 0,4g de extrato de levedura, 10g de manitol, 0,5g de  $K_2HPO_4$ , 0,2g de  $MgSO_4$ , 0,1g de NaCl e 11g de Agar. Corrigira o pH para 6,8.

## APÊNDICE 07.

**Meio KING-B:** Foram adicionados em 1L de água destilada 20,0g de protease peptona, 10,0g de glicerol, 1,5g de  $K_2HPO_4$ , 1,5g de  $MgSO_4$  e 15,0g de Agar.

## APÊNDICE 08



**Meio CAS:** Foi dissolvido 60,5 mg de CAS em 50 mL de água destilada e misturado com uma solução de  $\text{Fe}^{3+}$  ( $1 \text{ mmol L}^{-1}$   $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $10 \text{ mmol L}^{-1}$   $\text{HCl}$ ). Em seguida foi adicionados 72,9 mg de hexadecyltrimethylammonium bromide (HDTMA) previamente dissolvido em 40 mL de água. A solução azul-escura resultante foi autoclavada, refrigerada a  $50/60^\circ\text{C}$  e misturada com 900 mL de água estéril contendo  $15 \text{ g L}^{-1}$  agar (também mantido a  $50/60^\circ\text{C}$ ).