

## MICROBIOLIZAÇÃO DE SEMENTES DE ALFACE COM *Bacillus* spp. PARA CONTROLE DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

NATALIA DE JESUS FERREIRA COSTA<sup>1</sup>  
MÔNICA SHIRLEY BRASIL DOS SANTOS E SILVA<sup>2</sup>  
ANTONIA ALICE COSTA RODRIGUES<sup>2</sup>  
ERLEN KEILA CANDIDO E SILVA<sup>2</sup>  
GILSON SOARES DA SILVA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal Rural de Pernambuco.

<sup>2</sup> Universidade Estadual do Maranhão.

Autor para correspondência: natalia.jfc@gmail.com

**RESUMO:** O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da microbiolização de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) cv. ‘Grandes Lagos Americana’ e ‘Americana Delícia’ com diferentes isolados de *Bacillus* para controle de fungos fitopatogênicos, assim como avaliar a qualidade sanitária e a taxa de transmissão dos patógenos associados a estas sementes. A análise sanitária das sementes foi realizada por meio do método do *Blotter Test*. Para quantificar a taxa de transmissão dos fitopatógenos, 400 sementes de cada cultivar foram semeadas em bandejas contendo substrato composto de solo:areia grossa:vermiculita (3:1:1), avaliando-se aos 7, 14 e 21 dias após a semeadura. Fragmentos de folha, caulículo e raiz foram transferidos para placa de Petri contendo meio de cultura BDA e incubados em câmara BOD. A avaliação da transmissão foi realizada sete dias após a incubação em relação a presença de patógenos, quantificando-se a porcentagem de transmissão. As sementes de alface foram microbiolizadas com diferentes isolados de *Bacillus*: MGSS B274 – *B. amyloliquefaciens*; MGSS B271, MGSS B272, MGSS B273 – *B. methylotrophicus*; e MGSS B275 – *B. thuringiensis*. Após o tratamento, as sementes foram plaqueadas em meio BDA e incubadas. Os resultados mostraram que as sementes da cv. ‘Grandes Lagos Americana’ apresentaram a maior porcentagem de contaminação por fungos nos testes de sanidade e transmissão. Os isolados MGSS B274 e o MGSS B273 foram os mais eficientes no controle dos fungos transmitidos pelas sementes de alface das cultivares avaliadas.

**Termos para Indexação:** biocontrole, *Lactuca sativa* L., sanidade de sementes,

Indexed by Portal de Periódicos da UFPE (Universidade Federal de Pernambuco)

plonght to lot pl COBE

## MICROBIOLIZATION OF LETTUCE SEEDS WITH *Bacillus* spp. TO CONTROL PLANT PATHOGENIC FUNGI

**ABSTRACT:** This study aimed to evaluate the effect of the microbiolization of lettuce seeds (*Lactuca sativa* L.) cv. ‘Grandes Lagos Americana’ and ‘Americana Delícia’ with *Bacillus* spp. to control plant pathogenic fungi as well as assessing the health quality, and the rate of transmission of pathogens associated with these seeds. The health quality of the seeds was carried out using the *Blotter Test* method. To quantify the transmission rate of

phytopathogens, 400 seeds of each cultivars were sowing in trays containing substrate soil:gravel:vermiculite (3:1:1) and the evaluations carried out at 7, 14 and 21 days after sowing. Fragments of leaf, the stem, and root were plated in PDA medium in Petri dish and incubated in BOD. Transmission assessment was performed seven days after incubation as for the presence of pathogens, quantifying the percentage of transmission. The lettuce seeds were microbiolized with different *Bacillus* isolates: MGSS B274 – *B. amyloliquefaciens*; MGSS B271, MGSS B272, MGSS B273 – *B. methylotrophicus*; and MGSS B275 – *B. thuringiensis*. After treatment, the seeds were placed in Petri dishes containing BDA medium and incubated. The results showed that the seeds of cv. ‘Grandes Lagos Americana’ had the highest percentage of fungi contamination in the health quality and transmission tests. Isolates MGSS B274 and MGSS B273 were the most efficient in controlling the fungi transmitted by the lettuce seeds of the evaluated cultivars.

**Index terms:** biocontrol, *Lactuca sativa* L., seeds health, plant pathogens.

## INTRODUÇÃO

As sementes são consideradas um dos insumos mais importantes na produção agrícola, contudo, esta produção pode ser reduzida pelos fitopatógenos transmissíveis pelas mesmas, como fungos, bactérias, vírus e nematoides, e, além disso, podem ser disseminados a longas distâncias e introduzidos em novas áreas de cultivo. Desta forma, a produção econômica de hortaliças, depende de práticas culturais adequadas e o uso de sementes saudáveis, garantindo o estabelecimento de lavouras isentas de patógenos, vigorosas e com custos de implantação reduzido (PEREIRA *et al.*, 2015).

A alface (*Lactuca sativa* L.) é a hortaliça folhosa mais consumida no mundo, e uma das mais importantes do ponto de vista econômico (SALA; COSTA, 2012). A grande suscetibilidade da alface às doenças torna-se um fator limitante da produção dessa hortaliça, sendo conhecidas aproximadamente 75 doenças, muitas delas transmitidas por sementes (LOPES; QUEZADO-DUVAL; REIS, 2010).

O uso de defensivos químicos para a proteção de plantas contra fitopatógenos, embora seja um dos métodos mais utilizados, apresenta uma série de

desvantagens como danos ao meio ambiente, possibilidade de ocorrer resistência dos patógenos à determinados compostos (NAGARAJKUMAR; BHASKARAN; VELAZHAHAN, 2004), aumento do custo da produção e intoxicação aguda ou crônica do ser humano, resultante do contato direto e indireto com esses produtos (SILVA, 2017). Por essa razão, a busca por métodos alternativos de tratamento de sementes para o controle de fitopatógenos, como a utilização do controle biológico, têm crescido nos últimos anos (MORANDI; BETTIOL, 2009; NASCIMENTO *et al.*, 2020).

No manejo integrado de doenças, o emprego do controle biológico no tratamento sanitário de sementes tem alcançado resultados promissores por meio da microbiolização, que consiste na aplicação de microrganismos vivos às sementes para o controle de doenças, bem como promover o crescimento das plantas (DINIZ *et al.*, 2009; ETHUR *et al.*, 2006). Dentre esses microrganismos, espécies do gênero *Bacillus* têm apresentado resultados satisfatórios no controle de fitopatógenos associados às sementes.

As bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* são gram-positivas, aeróbicas ou

anaeróbicas facultativas e formadoras de endósporos. Essa última característica permite que estas bactérias sejam resistentes às mudanças ambientais, sendo este fato de grande importância para a produção de inoculantes (TEJERA; HEYDRICH; ROJAS, 2012).

Diversos estudos têm comprovado a versatilidade do uso do gênero *Bacillus* na agricultura. A utilização de espécies de *Bacillus* como agentes promotores de crescimento e biocontroladores de doenças de plantas, tornam o seu uso um método de controle eficiente, prático, econômico e ambientalmente sustentável (SHAFI; TIAN; JI, 2017). Estes microrganismos atuam também como indutores de resistência, provocando alterações citoquímicas durante o ataque de patógenos (SHAN *et al.*, 2013; KLOEPPER; RYU; ZHANG, 2004).

Isolados de *Bacillus* spp. podem ter ação inibitória sobre patógenos por

meio de diferentes mecanismos de ação, como competição, produção de antibióticos e liberação de compostos voláteis ou pela interação desses mecanismos (DOURADO *et al.*, 2020). Portanto, a microbiolização de sementes com *Bacillus* spp. tem desempenhado um importante papel para o controle de patógenos transmitidos por sementes, comprovado em estudos desenvolvidos com sementes de arroz (NASCIMENTO *et al.*, 2020), feijão (TORRES *et al.*, 2017) e pimentão (DOURADO *et al.*, 2020).

Diante disto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da microbiolização de sementes de alface com diferentes isolados de *Bacillus* spp. para controle de fungos fitopatogênicos, bem como avaliar a qualidade sanitária e a taxa de transmissão dos patógenos associados a estas sementes.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia do Núcleo de Biotecnologia Agrônômica da Universidade Estadual do Maranhão –

UEMA, São Luís – MA. Foram utilizadas sementes de alface não tratadas das cultivares ‘Grandes Lagos Americana’ e ‘Americana Delícia’.

### Avaliação da qualidade sanitária das sementes

A análise da qualidade sanitária das sementes foi realizada através do método *Blotter Test* (BRASIL, 2009). As sementes foram inicialmente desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1,5 % por 1 minuto, seguida de imersão em álcool a 50 % por 30 segundos, e duas lavagens em água destilada e esterilizada (ADE). Após o processo de desinfestação, as sementes foram distribuídas em placas de Petri esterilizadas, contendo três camadas de papel de filtro esterilizado e umedecido com ADE. Foram plaqueadas 400 sementes, de cada cultivar,

distribuídas em 20 repetições. As sementes foram incubadas em BOD, à temperatura de aproximadamente  $26 \pm 5$  °C e fotoperíodo de 12 h, durante sete dias.

Após o período de incubação, observaram-se as colônias fúngicas das plântulas e das sementes não germinadas, com auxílio de um microscópio estereoscópico e óptico. Fragmentos das colônias fúngicas que se desenvolveram sobre as sementes foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar), para a obtenção de uma cultura pura e preparo de

lâminas para observação das estruturas das espécies fúngicas. A identificação foi realizada por meio do uso de chaves de

identificação, e os resultados foram expressos em percentual de ocorrência dos fungos.

### Quantificação da taxa transmissão de fitopatógenos associados às sementes

Para obtenção da taxa de transmissão, 400 sementes de cada cultivar de alface, foram semeadas em bandejas contendo substrato composto por solo, areia grossa e vermiculita na proporção 3:1:1. As avaliações foram realizadas 7, 14 e 21 dias após a semeadura (DAS).

Em cada época de avaliação, foram coletadas aleatoriamente 100 plântulas, lavadas em água corrente para retirada do excesso de substrato aderido ao sistema radicular e encaminhadas para análise em laboratório. De cada plântula foram removidos folha, caulículo e raiz, e em seguida, feita assepsia do material em hipoclorito de sódio (1 %) por 3 minutos, seguindo de lavagem com ADE. Fragmentos dos órgãos vegetais foram

distribuídos em placas de Petri, contendo meio de cultura BDA e o material incubado em BOD por sete dias, a  $25 \pm 2$  °C e fotoperíodo de 12 h. O órgão foi considerado infectado, quando foi possível identificar a colônia e/ou estruturas dos fungos sob microscópio estereoscópio e óptico.

Os dados obtidos foram expressos em taxa de transmissão do fungo da semente, para cada órgão da plântula, em função da incidência destes nas sementes e respectivas estruturas, que foram avaliados em diferentes épocas. A porcentagem de transmissão de cada patógeno, foi determinada através da fórmula de Goulart (1996):

$$\text{Transmissão (\%)} = \frac{\% \text{ de plântulas com determinado patógeno} \times (100)}{\text{incidência desses patógenos nas sementes}}$$

### Efeito de isolados de *Bacillus* spp. sobre fitopatógenos associados às sementes de alface

Foram utilizados cinco isolados de *Bacillus*, pertencentes à Coleção de Fitopatógenos “Profº Gilson Soares da Silva”, da Universidade Estadual do Maranhão, sob números MGSS B271, MGSS B272, MGSS B273 (*B. methylotrophicus*), MGSS B274 (*B. amyloliquefaciens*), MGSS B275 (*B. thuringiensis*), identificados molecularmente por Nascimento *et al.* (2016). Os isolados foram repicados para placas de Petri contendo meio de cultura BDA e incubados a 28 °C por 48 h e fotoperíodo de 12 h em BOD, para serem utilizados na microbiolização das sementes de alface.

A metodologia utilizada na microbiolização das sementes, seguiu

aquela preconizada por Ludwig *et al.* (2009) com modificações. As sementes foram imersas nas suspensões dos isolados, preparada com solução salina (NaCl 0,85 %), sendo a concentração ajustada para  $10^8$  UFC ml<sup>-1</sup> em espectrofotômetro ( $A_{540}=0,5$ ), e colocadas sob agitação constante, por 30 minutos a 50 rpm.

Após a microbiolização, as sementes eram distribuídas em placas de Petri contendo meio de cultura BDA. A avaliação foi realizada sete dias após a incubação em BOD à  $26 \pm 5$  °C e fotoperíodo de 12 h. A identificação das colônias fúngicas após o tratamento das sementes, procedeu-se da mesma forma na qual foi realizada na avaliação da qualidade sanitária das sementes.

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado com seis tratamentos, que corresponde aos cinco isolados de *Bacillus* spp. e a testemunha, distribuído em cinco repetições de 20 sementes cada. A testemunha correspondeu às sementes imersas em solução salina. Os resultados foram expressos em percentual de controle das espécies fúngicas encontradas nas

sementes de alface após a microbiolização com os isolados de *Bacillus* spp. Os dados obtidos foram transformados em  $\sqrt{x}$ , para normalização e homogeneização da distribuição dos dados amostrais, e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade, por meio do *software* estatístico SISVAR®. 5.7.

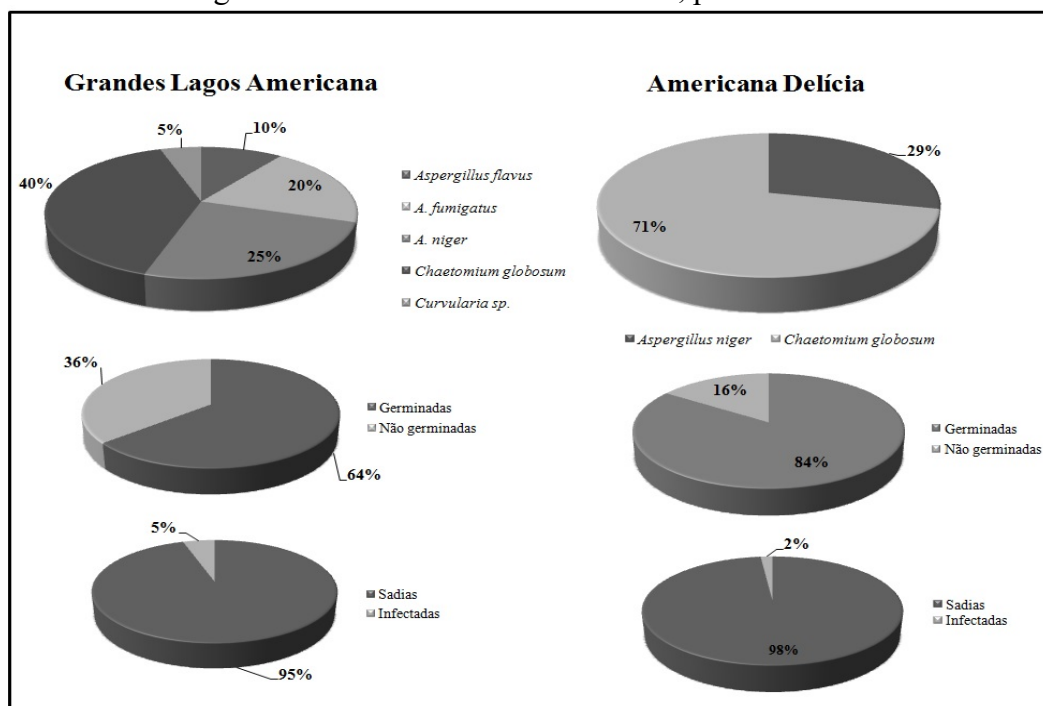
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Avaliação da qualidade sanitária das sementes

A qualidade sanitária das sementes de alface cultivar ‘Grandes Lagos Americana’, apresentou um percentual de 5 % de sementes infectadas, sendo a espécie *Chaetomium globosum* Kunze a de maior incidência (40 %), seguido por *Aspergillus niger* van Tieghem (25 %) e *Aspergillus fumigatus* Fresenius (20 %) (Figura 1). Nas sementes da cultivar

‘Americana Delícia’ foi observado um percentual de 2 % de sementes infectadas, e detectada a incidência de *C. globosum* (71 %) e *A. niger* (29 %). O percentual de germinação das sementes das cultivares ‘Grandes Lagos Americana’ e ‘Americana Delícia’ foi 64 % e 84 %, respectivamente (Figura 1).

**Figura 1.** Percentagem de germinação e incidência de patógenos em sementes de alface cultivares Grandes Lagos Americana e Americana Delícia, pelo método do *Blotter Test*.



As sementes são os veículos de disseminação mais eficientes, favorecendo a introdução de doenças em novas áreas e podendo reduzir a produtividade das safras (FLÁVIO *et al.*, 2014). De acordo com Marassi *et al.* (2008) a alta incidência de fitopatógenos em sementes está relacionado às condições ambientais de alta temperatura e umidade relativa do ar, pois estas aceleram o processo de colonização dos fungos nas sementes.

Ao verificar a qualidade sanitária de sementes de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) cv. Ipa 6, Silva *et al.* (2019) apresentaram resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho, cujas espécies fúngicas com maior incidência foram *A. fumigatus* (26

%), *A. flavus* (23 %) e *A. niger* (19 %). Paiva *et al.* (2016), avaliando a qualidade sanitária de diferentes lotes de sementes de alface cv. Simpson, encontraram 100 % de incidência de espécies do gênero *Aspergillus*.

Apesar de não ser considerado como patógeno primário, o gênero *Aspergillus* é comumente encontrado em ambientes de armazenamento, podendo provocar a contaminação de sementes após a colheita, e o apodrecimento das mesmas. Tal consequência poderá ser refletida em desuniformidade da germinação das sementes, ou até mesmo provocar a morte da semente antes que ocorra a germinação (MACHADO, 2012; PAIVA *et al.*, 2016).

### Quantificação da taxa transmissão de fitopatógenos associados às sementes

Na quantificação da taxa de transmissão de fitopatógenos nas sementes de alface cultivar ‘Grandes Lagos Americana’, foram detectados *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill., *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger* e *C. globosum*, em todos os órgãos das plântulas (raiz, caulículo e folha), nas três épocas de

avaliação (7, 14 e 21 DAS). As maiores taxas médias de transmissão, para esta cultivar, foi de *C. lunata* com percentual de 91,7 % para raiz, 98,4 % para o caule e 87,3 % para as folhas. Além da *C. lunata*, o *A. flavus* também apresentou uma alta taxa de transmissão (90,8 %) nas raízes das plântulas (Tabela 1).

**Tabela 1.** Percentagem de transmissão de patógenos de sementes para plântulas de alface cultivar Grandes Lagos Americana aos 7, 14 e 21 dias após a semeadura.

		Transmissão %			
		Grandes Lagos Americana			
Patógenos		Dias após a semeadura			Média
		7	14	21	
<i>Curvularia lunata</i>	Raiz	86,9	90,8	97,5	91,7
	Caulículo	97	98,5	99,7	98,4
	Folha	78	86	98	87,3
<i>Rhizopus stolonifer</i>	Raiz	65	74,6	87,9	75,8
	Caulículo	69,7	78,9	89,9	79,5
	Folha	17	27,9	38,6	27,8
<i>Aspergillus niger</i>	Raiz	20	39,7	46	35,2
	Caulículo	7	15,7	25,3	16
	Folha	48	52,1	56,5	52,2

<i>A. flavus</i>	Raiz	89	90,4	93	90,8
	Caulículo	38,9	46	49,9	44,9
	Folha	62,5	72	81,5	72
<i>A. fumigatus</i>	Raiz	74,9	87,4	94,1	85,5
	Caulículo	38,9	43,7	53,9	45,5
	Folha	62,5	68,9	72,1	67,8
<i>Chaetomium globosum</i>	Raiz	24	32	39,8	31,9
	Caulículo	74,6	79,8	85,4	79,9
	Folha	28,1	35,6	39,9	34,5

De acordo com a tabela 2, para a cultivar ‘Americana Delícia’, as maiores taxas médias de transmissão pertencem a *A. niger*, nas três épocas avaliadas e para os três órgãos da plântula, com percentuais de 91,7 %, 93,7 % e 95,3 %, respectivamente, para a raiz primária,

caulículo e folha. Além de *A. niger*, o outro patógeno detectado nesta cultivar foi *C. globosum*, cujas médias percentuais de transmissão foram 86,9 % para a raiz, 87,1 % para o caulículo e 46,6 % para a folha (Tabela 2).

**Tabela 2.** Percentagem de transmissão de patógenos de sementes para plântulas de alface cultivar Americana Delícia aos 7, 14 e 21 dias após a semeadura.

		Transmissão %			
		Americana Delícia			
Patógenos		Dias após a semeadura			Média
		7	14	21	
<i>Aspergillus niger</i>	Raiz	86,7	91,4	96,9	91,7
	Caulículo	88,9	94	98,1	93,7
	Folha	88,9	97,3	99,7	95,3
<i>Chaetomium globosum</i>	Raiz	78,9	89	93	86,9
	Caulículo	80,7	84,5	96	87,1
	Folha	37	45,8	56,9	46,6

Em experimento realizado com sementes de arroz (*Oryza sativa* L.), Silva *et al.* (2014) obtiveram resultados semelhantes aos observados na alface cultivar Grandes Lagos Americana neste trabalho, visto que *Curvularia lunata* foi detectada em todos os órgãos das plântulas de arroz, nas três épocas de avaliação, apresentando taxas médias de transmissão, nas três épocas, de 51,75 %; 44,16 % e

73,12 %, respectivamente, para a raiz primária, colmo e glumas.

Em outros estudos, também tem sido observado a transmissibilidade de fungos presentes nas sementes de diferentes culturas. Santos *et al.* (2014), estudando a transmissão e patogenicidade de fungos associados às sementes de forrageiras, encontraram 14 gêneros de fungos associados, dentre os quais *Curvularia* sp. apresentou uma alta taxa de

transmissão média (90 %) das sementes para as plântulas. Já Silva *et al.* (2019), quantificando a taxa de transmissão de espécies fúngicas associadas às sementes de duas cultivares de tomateiro, Ipa 6 e San Marzano, observaram que *R. stolonifer*, *Curvularia* sp., *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger* estavam presentes em todos os órgãos da plântula avaliados aos 7, 14 e 21 DAS.

Os fungos associados às sementes podem causar deterioração e serem transmitidos às plântulas, colonizando órgãos radiculares e aéreos. Por esta razão, a quantificação da taxa de transmissão é de suma importância para tornar claro o potencial epidemiológico das sementes (CASA; REIS; NERBASS, 2006).

### Efeito de isolados de *Bacillus* spp. sobre fitopatógenos associados às sementes de alface

As médias de incidência dos fungos após a microbiolização das sementes da cultivar 'Grandes Lagos Americana', indicaram que os isolados MGSS B273 (*B. methylophilus*) e MGSS B274 (*B. amyloliquefaciens*) controlaram 100 % todos os patógenos, e suas médias foram significativamente diferentes em relação à testemunha em todos os tratamentos. O tratamento testemunha corresponde à incidência dos patógenos presentes nas sementes não microbiolizadas com *Bacillus* spp., sendo

*A. niger* e *R. stolonifer* as espécies fúngicas com as maiores médias de incidência, 13.60 e 12.40, respectivamente (Tabela 3). Apesar dos isolados MGSS B273 e MGSS B274 apresentarem os melhores resultados, todos os isolados testados diferiram significativamente da testemunha, com percentuais de controle que variam de 87 a 100 %, em que *A. fumigatus*, *C. lunata*, *Trichoderma* sp. e *Rhizopus stolonifer* foram 100 % controlados (Tabela 3).

**Tabela 3.** Médias de incidência e percentual de controle de fungos associados às sementes de alface cultivar Grandes Lagos Americana microbiolizadas com isolados de *Bacillus* spp.

Incidência (INC) (n° médio Colônia)	Test.	Tratamentos					CV (%)	
		MGSS B274	MGSS B272	MGSS B275	MGSS B271	MGSS B273		
<i>A. flavus</i>	INC	6.40 a*	0.00 c	0.00 c	0.00 c	1.80 b	0.00 c	28,8
	Ctr (%)		100	100	100	94	100	
<i>A. fumigatus</i>	INC	5.20 a	0.00 b	0.00 b	0.00 b	0.00 b	0.00 b	39
	Ctr (%)		100	100	100	100	100	
<i>A. niger</i>	INC	13.60 a	0.00 c	1.60 b	2.20 b	0.00 c	0.00 c	36,7
	Ctr (%)		100	97	88	100	100	
<i>Chaetomium globosum</i>	INC	3.20 a	0.00 c	0.00 c	1.60 b	0.00 c	0.00 c	19,8
	Ctr (%)		100	100	87	100	100	
<i>Curvularia lunata</i>	INC	6.40 a	0.00 b	0.00 b	0.00 b	0.00 b	0.00 b	39
	Ctr (%)		100	100	100	100	100	
<i>Trichoderma</i> sp.	INC	1.60 a	0.00 b	0.00 b	0.00 b	0.00 b	0.00 b	23,6
	Ctr (%)		100	100	100	100	100	
<i>Rhizopus stolonifer</i>	INC	12.40 a	0.00 b	0.00 b	0.00 b	0.00 b	0.00 b	26
	Ctr (%)		100	100	100	100	100	



Test – testemunha; (MGSS B274) – *B. amyloliquefaciens*; (MGSS B271, MGSS B272, MGSS B273) – *B. methylotrophicus*; (MGSS B275) – *B. thuringiensis*; Ctr (%) – percentual de controle. CV (%) – Coeficiente de variação. \*Colunas de diferentes tratamentos, seguidas da mesma letra, não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade.

Em relação a cultivar de alface ‘Americana Delícia’, o tratamento testemunha, para todas as espécies fúngicas detectadas, diferiu significativamente dos demais tratamentos com os isolados de *Bacillus* spp., sendo as maiores médias de incidência observadas nos fungos *A. niger* (18.40) e *R. stolonifer* (14.00), mesmo resultado observado na

cultivar ‘Grandes Lagos Americana’ (Tabela 4). Todos isolados de *Bacillus* spp. testados apresentaram bons resultados para o controle de fungos, com percentuais variando de 84 a 100 %, sendo *Aspergillus* sp., *A. flavus* e *A. fumigatus* 100 % controlados por todos os isolados de *Bacillus* spp. (Tabela 4).

**Tabela 4.** Médias de incidência e percentual de controle de fungos associados às sementes de alface cultivar Americana Delícia microbiolizadas com isolados de *Bacillus* spp.

Incidência (INC) (médio n° Colônia)	Test.	Tratamentos					CV (%)	
		MGSS B274	MGSS B272	MGSS B275	MGSS B271	MGSS B273		
<i>Aspergillus</i> sp.	INC	7.20 a*	0.00 b	0.00 b	0.00 b	0.00 b	0.00 b	25,7
	Ctr (%)		100	100	100	100	100	
<i>A. flavus</i>	INC	5.20 a	0.00 b	0.00 b	0.00 b	0.00 b	0.00 b	30,2
	Ctr (%)		100	100	100	100	100	
<i>A. fumigatus</i>	INC	4.80 a	0.00 b	0.00 b	0.00 b	0.00 b	0.00 b	29
	Ctr (%)		100	100	100	100	100	
<i>A. niger</i>	INC	18.40 a	0.00 d	1.60 c	0.00 d	3.80 b	0.00 d	25,5
	Ctr (%)		100	98	100	84	100	
<i>Curvularia lunata</i>	INC	2.00 a	0.00 b	0.00 b	1.20 a	0.00 b	0.00 b	37,6
	Ctr (%)		100	100	96	100	100	
<i>Rhizopus stolonifer</i>	INC	14.00 a	0.00 c	3.00 b	0.00 c	2.40 b	0.00 c	16,8
	Ctr (%)		100	89	100	94	100	

Test – testemunha; (MGSS B274) – *B. amyloliquefaciens*; (MGSS B271, MGSS B272, MGSS B273) – *B. methylotrophicus*; (MGSS B275) – *B. thuringiensis*; Ctr (%) – percentual de controle. CV (%) – Coeficiente de variação. \*Colunas de diferentes tratamentos, seguidas da mesma letra, não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade.

Os isolados MGSS B273 e o MGSS B274 apresentaram os melhores resultados, controlando 100 % todos os fitopatógenos associados às sementes de alface, para ambas cultivares testadas (Tabela 3 e 4). Dentre os fatores que justificam o ótimo desempenho dos

isolados MGSS B274 e MGSS B273, está o fato das espécies *B. amyloliquefaciens* e *B. methylotrophicus* produzirem uma variedade de antibióticos lipopeptídeos, sendo os principais a surfactina, a iturina e a fengicina, considerados os principais compostos que conferem capacidade de

biocontrole de fitopatógenos (ARGUELLES-ARIAS *et al.*, 2009; FRIKHA-GARGOURI *et al.*, 2017).

*Bacillus amyloliquefaciens* e *B. methylotrophicus* são consideradas eficientes colonizadores de diferentes habitats, devido a sua capacidade de formar endósporos, que são estruturas de resistência que conferem as bactérias a capacidade de crescer em uma ampla gama de temperatura, produzir antibióticos que inibem o crescimento de fitopatógenos, além atuarem como promotores de crescimento de plantas (RIOS-VELASCO *et al.*, 2016).

A microbiolização de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) com *B. amyloliquefaciens* foi capaz de inibir o desenvolvimento dos fungos fitopatogênicos: *Sclerotium rolfsii* Sacc, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, *Rhizoctonia solani* Kuhn, *Fusarium solani*, *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Cladosporium* spp., *Rizhopus* spp. e *Penicillium* spp. (TORRES *et al.*, 2017). Além do controle de fitopatógenos, Silveira *et al.* (2004) relataram que houve um incremento de 41,6 % da massa seca total da planta, ao microbiolizar sementes de pepino com *B. amyloliquefaciens*.

Dourado *et al.* (2020) observaram que a microbiolização de sementes de pimentão (*Capsicum annum* L.) com *B. methylotrophicus* controlou 100 % todos os fungos fitopatogênicos associados às sementes. Shan *et al.* (2013) verificaram que *B. methylotrophicus* provoca a inibição do crescimento de numerosos fungos fitopatogênicos *in vitro*, e identificaram ácido phenaminomethylacetic como a substância em *B. methylotrophicus* que é responsável pela inibição de fungos fitopatogênicos.

O sequenciamento do genoma de um isolado de *B. amyloliquefaciens* (FZB42), revelou que quase 10 % do genoma é responsável pela síntese de metabólitos antimicrobianos, como a

produção de lipopeptídeos e policetídeos com atividade antifúngica, antibacteriana e nematocida. Os lipopeptídeos cíclicos produzidos foram surfactina, bacilomicina, fengicina e o sideróforo bacilibactina (CHEN *et al.*, 2009).

Concentrações subletais de lipopeptídeos cíclicos e voláteis produzidos por *Bacillus* spp. associados a plantas desencadeiam vias de resistência sistêmica induzida (ISR), que protegem as plantas contra ataques de fungos, bactérias, vírus e nematodios. A estimulação de ISR por metabólitos bacterianos é provavelmente o principal mecanismo responsável pela ação de biocontrole do *B. amyloliquefaciens* FZB42 (CHOWDHURY *et al.*, 2015).

O gênero *Bacillus* possui grande potencial biotecnológico, sendo empregado na produção de antibióticos, enzimas e outros metabólitos de interesse para diversos setores da indústria, dentre eles o setor agrícola (MADIGAN *et al.*, 2016). As espécies desse gênero têm ocorrência cosmopolita e são encontradas em diversos tipos de substratos como solo, superfície de plantas, rizosfera, grãos armazenados, insetos mortos, dentre outros (MONNERAT *et al.*, 2020).

Um das vantagens do emprego de *Bacillus* spp. como agente de controle biológico é a sua especificidade aos organismos susceptíveis, o efeito não poluente ao meio ambiente, sua inocuidade aos animais e ausência de toxicidade nas plantas (WHITELEY; SCHNEPF, 1986). Por esta razão, as bactérias do gênero *Bacillus* estão entre as mais utilizadas no controle biológico, com diversos produtos comerciais registrados.

Diante destes resultados, fica evidente a necessidade de submeter as sementes à tratamentos que visem garantir a sua qualidade sanitária, e consequentemente evitar que a futura planta seja uma fonte de inóculo,

provocando a disseminação de fitopatógenos para o restante da lavoura.

## CONCLUSÕES

A microbiolização de sementes com isolados de *Bacillus* spp. é um método promissor no controle de fungos fitopatogênicos transmissíveis por sementes de alface.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) e a Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), pelo apoio financeiro da pesquisa.

## REFERÊNCIAS

- ARGUELLES-ARIAS, A. *et al.* *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. **Microbial Cell Factories**, Gdansk, v. 8, n. 63, 1-12, 2009.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras Para Análise de Sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 2009.
- CASA, R. T.; REIS, E. M.; NERBASS, F. R. Implicações epidemiológicas da transmissão de fungos em sementes de milho. *In*: \_\_\_\_\_. **Manejo de doenças de grandes culturas: feijão, batata, milho e sorgo**. Lavras: UFLA, 2006. p. 202-212.
- CHEN, X. H. *et al.* Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. **Journal of Biotechnology**, Amsterdã, v. 140, n.1-2, p. 27-37, 2009.
- CHOWDHURY *et al.* Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 – a review. **Frontiers in Microbiology**, Paris, v. 6, p. 1-11, 2015.
- DINIZ, K. A. *et al.* Sweet pepper seed responses to inoculation with microorganisms and coating with micronutrients, aminoacids and plant growth regulators. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, n. 3, p. 293-297, 2009.
- DOURADO, G. F. *et al.* Alternative seed treatment methods for plant pathogen control in sweet pepper crops. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 15, n. 3, p. 1-10, 2020.
- ETHUR, L. Z. *et al.* Sanidade de sementes e emergência de plântulas de nabo forrageiro, aveia preta e centeio submetidas a tratamentos com bioprotetor e fungicida. **Ciência e Natura**, Santa Maria, v. 28, n. 2, p. 17-27, 2006.

FLÁVIO, N. S. D. S. *et al.* Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de sorgo tratadas com extratos aquosos e óleos essenciais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.35, n.1, p.7-20, 2014.

FRIKHA-GARGOURI, O. *et al.* Lipopeptides from a novel *Bacillus methylotrophicus* 39b strain suppress agrobacterium crown gall tumours on tomato plants. **Pest Management Science**, Oxford, v.73, n. 3, p. 568-574, 2017.

GOULART, A. C. Transmissão de *Bipolaris sorokiniana* de sementes ao coleóptilo do trigo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 5-9, 1996.

KLOEPPER, J. W.; RYU, C. M.; ZHANG, S. Induced Systemic Resistance and Promotion of Plant Growth by *Bacillus* spp. **Phytopathology**, St. Paul, v. 94, n. 11, p. 1259-1266, 2004.

LOPES, C. A.; QUEZADO-DUVAL, A. M.; REIS, A. **Doenças da alface**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2010.

LUDWIG, J. *et al.* Microbiolização de sementes para o controle da mancha-parda e da escaudadura em arroz irrigado. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 34, n. 5, p. 322-328, 2009.

MACHADO, J. C. Patologia de sementes: significado e atribuições. *In*: CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. (ed.). **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Jaboticabal: Funep, 2012. p. 524-590.

MADIGAN, M. T. *et al.* **Microbiologia de Brock** 14<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MARASSI, A. C. *et al.* Microbiota isolada de amostras de arroz provenientes do Estado do Maranhão destinadas ao consumo humano, em áreas de ocorrência de beribéri. **Revista Ciência Vida**, Seropédica, v.28, n. 8, p. 150-152, 2008.

MONNERAT, R. *et al.* **Manual de produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de bactérias do gênero *Bacillus* para uso na agricultura**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2020. 46 p. (Documentos, n. 369)

MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. *In*: BETTIOL, W; MORANDI, M. A. B. (ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectiva**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p. 7-14.

NAGARAJKUMAR, M.; BHASKARAN, R.; VELAZHAHAN, R. Involvement of secondary metabolites and extracellular lytic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* in inhibition of *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen. **Microbiological Research**, Amsterdam, v. 159, n. 1, p. 73-81, 2004.

NASCIMENTO, I. O. *et al.* Isolation, identification and *in vitro* evaluation of *Bacillus* spp. in control of *Magnaporthe oryzae* comparing evaluation methods. **African Journal of Agricultural Research**, Lagos, v. 11, n. 19, p. 1743-1749, 2016.

NASCIMENTO, I. O. *et al.* Microbiolização de sementes de arroz com *Bacillus* spp. na redução de patógenos. **Research, Society and Development**, Vargem Grande Paulista, v. 9, n. 10, p. 1-21, 2020.

PAIVA, C. T. C. *et al.* Qualidade fisiológica e sanitária de sementes comerciais de alface e repolho. **Revista de Ciências Agroambientais**, Alta Floresta, v. 14, n. 1, p. 53-59, 2016.

PEREIRA, R. B. *et al.* **Tratamento de Sementes de Hortaliças**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2015. (Circular Técnica, n.140, 16p).

RIOS-VELASCO, C. *et al.* Identification and antagonistic activity *in vitro* of *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp. isolates against common phytopathogenic fungi. **Revista Mexicana de Fitopatología**, Montecillo, v. 34, n. 1, p. 84-99, 2016.

SALA, F. C.; COSTA, C. P. Retrospectiva e tendência da alfacicultura Brasileira. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 2, p. 187-194, 2012.

SANTOS, G. R. *et al.* Sanitary analysis, transmission and pathogenicity of fungi associated with forage plant seeds in tropical regions of Brazil. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 36, n. 1, p. 054-062, 2014.

SHAFI, J.; TIAN, H.; JI, M. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, Abingdon, v. 31, n. 3, p. 446-459, 2017.

SHAN, H. *et al.* Biocontrol of rice blast by the phenaminomethylacetic acid producer of *Bacillus methylotrophicus* strain BC79. **Crop Protection**, Guildford, v. 44, p. 29-37, 2013.

SILVA, M. S. B. S. *et al.* Health quality and reduction of pathogenic transmission in tomato seeds using plant extracts. **Australian Journal of Crop Science**, Brisbane, v. 13, n. 4, p. 635-641, 2019.

SILVA, M. S. B. S. *et al.* Sanidade de sementes de arroz, biocontrole, caracterização e transmissão de *Curvularia lunata* em semente-plântula de arroz. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 61, n. 4, p. 511-517, 2014.

SILVA, W. B. Os riscos no uso indiscriminado de agrotóxicos: uma contaminação invisível. **Informativo Técnico do Semiárido**, Pombal, v. 11, n. 1, p. 52-66, 2017.

SILVEIRA, E. B. *et al.* Bacterização de sementes e desenvolvimento de mudas de pepino. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 2, p. 217-221, 2004.

TEJERA, B.; HEYDRICH, M.; ROJAS, M. M. Antagonismo de *Bacillus* spp. frente a hongos fitopatógenos del cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). **Revista de Protección Vegetal**, San José de las Lajas, v. 27, n. 2, p. 117-122, 2012.

TORRES, M. J. *et al.* Biological activity of the lipopeptide-producing *Bacillus amyloliquefaciens* PGPBacCA1 on common bean *Phaseolus vulgaris* L. pathogens. **Biological Control**, San Diego, v. 105, p. 93-99, 2017.

WHITELEY, H. R.; SCHNEPF, H. E. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 40, p. 549- 576, 1986.