



## Heat and biological treatment of lettuce seeds in the control of plant pathogenic fungi

### Tratamento térmico e biológico de sementes de alface no controle de fungos fitopatogênicos

COSTA, Natalia de Jesus Ferreira<sup>(1)</sup>; SILVA, Mônica Shirley Brasil dos Santos<sup>(2)</sup>; SILVA, Erlen Keila Candido<sup>(3)</sup>; OLIVEIRA, Anna Christina Sanazário de<sup>(4)</sup>; RODRIGUES, Antonia Alice Costa<sup>(5)</sup>

<sup>(1)</sup> 0000-0002-6171-2576; Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, PE, Brasil. E-mail: natalia.jfc@gmail.com.

<sup>(2)</sup> 0000-0001-7060-2304; Agência Estadual de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural do Maranhão. São Luís, MA, Brasil. E-mail: shirleymonica.85@gmail.com.

<sup>(3)</sup> 0000-0002-3794-3710; Universidade Estadual do Maranhão. São Luís, MA, Brasil. E-mail: erlenkeila@yahoo.com.br.

<sup>(4)</sup> 0000-0002-9769-0567; Universidade Estadual do Maranhão. São Luís, MA, Brasil. E-mail: annasanazario@gmail.com.

<sup>(5)</sup> 0000-0002-9084-0868; Universidade Estadual do Maranhão. São Luís, MA, Brasil. E-mail: aacrodriues@outlook.com.

O conteúdo expresso neste artigo é de inteira responsabilidade dos/as seus/as autores/as.

#### ABSTRACT

The health quality of lettuce seeds (*Lactuca sativa* L.) is a fundamental attribute to guarantee the establishment of the culture, and to reduce the costs of the crop. Therefore, the objective of this work was to evaluate the health quality and the effect of heat and biological treatment in the control of plant pathogenic fungi associated with lettuce seeds cv. 'Simpson'. Health assessment was performed using the *Blotter Test* method. During the heat treatment, the seeds were submitted to different combinations of temperature (45, 48 and 50° C) and time (25 and 30 min.) in a bain-marie. Already, in carrying out the biological treatment, the seeds were microbiolozated with isolates of *Bacillus methylotrophicus* (MGSS B271, MGSS B272 and MGSS B273), *B. amyloliquefaciens* (MGSS B274) and *B. thuringiensis* (MGSS B275). After performing the treatments, the incidence, percentage of pathogen control and seed germination were evaluated. In the lettuce seed health test, *Aspergillus fumigatus* was the species with the highest incidence. The heat treatment at 48° C/ 25 min and 51 °C/ 30 min, and the biological treatment with isolates MGSS B271, MGSS B273 and MGSS B275 were the most efficient in the control of plant pathogenic fungi associated with lettuce seeds.

#### RESUMO

A qualidade sanitária de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) é um atributo fundamental para garantir o estabelecimento da cultura e na redução dos custos da lavoura. Por isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade sanitária e o efeito do tratamento térmico e biológico no controle de fungos fitopatogênicos associados a sementes de alface cultivar 'Simpson'. A avaliação sanitária foi realizada por meio do método *Blotter Test*. Durante o térmico, as sementes foram submetidas a diferentes combinações de temperatura (45, 48 e 50° C) e tempo (25 e 30 min.) em banho-maria. Já, na realização do tratamento biológico, as sementes foram microbiolizadas com isolados de *Bacillus methylotrophicus* (MGSS B271, MGSS B272 e MGSS B273), *B. amyloliquefaciens* (MGSS B274) e *B. thuringiensis* (MGSS B275). Após os tratamentos, foi avaliada a incidência, o percentual de controle dos patógenos e a porcentagem de germinação das sementes. No teste de sanidade das sementes de alface, *Aspergillus fumigatus* foi a espécie com maior incidência. O tratamento térmico a 48° C/ 25 min e 51 °C/ 30 min, e o biológico com os isolados MGSS B271, MGSS B273 e MGSS B275 foram os mais eficientes no controle de fungos fitopatogênicos associados às sementes de alface.

#### INFORMAÇÕES DO ARTIGO

##### Histórico do Artigo:

Submetido: 05/11/2021

Aprovado: 12/03/2022

Publicação: 01/04/2022



##### Keywords:

Alternative control,  
Plant pathogens,  
*Lactuca sativa* L.

##### Palavras-Chave:

Controle alternativo,  
Fitopatógenos,  
*Lactuca sativa* L.

## Introdução

A alface (*Lactuca sativa* L.), hortaliça folhosa mais consumida no mundo é propagada por meio de sementes, cuja qualidade tanto sanitária quanto fisiológica é fundamental para um uniforme e rápido estabelecimento da cultura em campo, visto que tal hortaliça possui um ciclo de produção curto (Paiva et al., 2016; Nascimento et al., 2011). Com isso, a crescente expansão da produção e comercialização de hortaliças têm aumentado as exigências para com o mercado sementeiro, demandando sementes com altos padrões de qualidade sanitária, fisiológica, física e genética (Pedroso, 2009).

Entre os principais fatores que afetam a qualidade sanitária e fisiológica das sementes está a sua associação com patógenos, principalmente fungos, que durante a pós-colheita podem ser disseminados por meio das sementes a curtas e longas distâncias, ocasionar a deterioração das sementes durante o período de armazenamento, contaminar equipamentos e maquinários de beneficiamento das sementes, bem como introduzidos em áreas isentas do patógeno, limitando a produção das hortaliças (Machado et al., 2006; Pereira et al., 2015). Em meio aos danos provocados pela associação entre semente e patógeno, pode-se observar uma redução da germinação e vigor das plântulas, além das infecções nas plântulas, logo após sua germinação e emergência, e de alguns sintomas nas plantas, como, por exemplo, manchas foliares ou podridão de raízes (Pereira et al., 2015; Cunha et al., 2017).

Dessa forma, se faz necessário o manejo dessas sementes associadas com fitopatógenos, como a realização de tratamentos que sejam viáveis, de fácil execução, baixo custo e alta eficácia no controle de patógenos. Estes tratamentos podem ser realizados por meio de métodos químicos, físicos e biológicos (Pereira et al., 2015). Dentre os tipos de tratamento, o tratamento químico de sementes tem sido o mais empregado para o controle de fitopatógenos, contudo a falta de assistência técnica adequada e o uso indiscriminado desses produtos químicos têm provocado efeitos nocivos ao meio ambiente e gerado resistência dos patógenos a diversas moléculas (Nagarajkumar et al., 2004), além do aumento da demanda por produtos agrícolas cultivados em sistemas sustentáveis sem o emprego de agrotóxicos (Matos et al., 2018). Porém, métodos de controles alternativos, como o físico e biológico, têm apresentando resultados significativos na eliminação ou redução do inóculo de fitopatógenos associados às sementes (Nascimento et al., 2020; Santos et al., 2016), além de reduzir os custos de produção, amenizar os impactos ambientais por conta do uso de agroquímicos e proporcionar a oferta de alimentos mais saudáveis (Silva et al., 2020).

A termoterapia é um método de controle físico que se baseia na exposição das sementes ao calor úmido ou seco, em que o período de exposição ao calor é capaz de controlar os fitopatógenos sem prejudicar a qualidade fisiológica das sementes (Françoso & Barbedo, 2014). Além desse método, a aplicação de microrganismos vivos às sementes, como espécies de bactérias do gênero *Bacillus*, também tem se mostrado uma alternativa promissora no controle de patógenos, atuam por meio de diferentes mecanismos de ação, como antibiose,

competição e liberação de compostos voláteis (Dourado et al., 2020), bem como promotores de crescimento da planta (Diniz et al., 2009). Com isso, tanto a termoterapia quanto o controle biológico tem produzido resultados positivos no controle de fitopatógenos transmitidos por sementes de hortaliças (Costa et al., 2021; Cunha et al., 2017; Dourado et al., 2020; Silva, 2020; Pedroso et al., 2018).

Assim sendo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade sanitária das sementes de alface, e o efeito do tratamento térmico e do biológico no controle de fungos fitopatogênicos associados a essas sementes.

### **Procedimentos Metodológicos**

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia e em casa de vegetação (2°35'34.2"S; 44°12'45.3"W) da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), São Luís/MA, Brasil. Sementes de alface, não tratadas, cultivar 'Simpson' foram empregadas para realização dos experimentos.

#### *Qualidade sanitária das sementes de alface*

A qualidade sanitária das sementes foi avaliada por meio do método *Blotter Test* (Brasil, 2009). Foram plaqueadas 400 sementes, divididas em 20 repetições, em placas de Petri esterilizadas contendo três camadas de papel de filtro esterilizado e umedecido com água destilada e esterilizada (ADE). As sementes foram previamente desinfestadas durante 1 minuto em hipoclorito de sódio (1,5 %), 30 segundos em álcool (50 %), seguido de duas lavagens em ADE. Logo após, essas sementes foram incubadas durante sete dias em câmara incubadora tipo BOD (Biological Oxygen Demand) a  $26 \pm 5^\circ$  C e fotoperíodo de 12 h. A identificação das colônias fúngicas detectadas nas sementes foi realizada a nível de gênero e espécie, com base nas características morfológicas do fungo, com auxílio de chave de identificação (Barnett et al., 1972; Ellis, 1971), microscópio estereoscópico e óptico. Foram contabilizados os fungos detectados, sementes germinadas, não germinadas, sadias e contaminadas. Os resultados foram expressos em porcentagem de incidência de cada espécie.

#### *Tratamento térmico das sementes de alface*

Sementes acondicionadas em sacos de filó, foram imersas em água aquecida em banho-maria, e testada diferentes combinações de tempos e temperaturas:  $45^\circ$  C/25 min,  $45^\circ$  C/30 min,  $48^\circ$  C/25 min,  $48^\circ$  C/30 min,  $51^\circ$  C/25 min e  $51^\circ$  C/30 min. Após a realização do tratamento térmico, as sementes foram secas com papel filtro e plaqueadas em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar), sendo utilizados extrato de 200g de batata, 20g de dextrose e 20 g de ágar para 1000 mL de água destilada. O material foi mantido em câmara BOD a  $25 \pm 2^\circ$  C e fotoperíodo de 12 h. A testemunha foi representada por sementes imersas apenas em água destilada. Sete dias após o tratamento foi realizada a avaliação da

incidência de fungos detectados nas sementes e calculado o percentual de controle e de germinação das sementes de cada tratamento. O delineamento adotado foi inteiramente casualizado com sete tratamentos e cinco repetições com 20 sementes cada, que constituiu uma unidade experimental.

#### *Tratamento biológico de sementes de alface com isolados de Bacillus spp.*

Na avaliação do controle biológico de fitopatógenos associados a sementes de alface foram empregados cinco isolados *Bacillus* [MGSS B271, MGSS B272, MGSS B273 (*B. methylotrophicus*), MGSS B274 (*B. amyloliquefaciens*), MGSS B275 (*B. thuringiensis*)], obtidos da coleção de fitopatógenos “*Profº Gilson Soares da Silva*”, da UEMA – São Luís/MA. Para obtenção das culturas puras, os isolados de *Bacillus* spp. foram cultivados em meio de cultura BDA, e incubados em BOD por 48 h a 28° C e fotoperíodo de 12 h. A microbiolização das sementes de alface com *Bacillus* spp. foi realizada conforme metodologia modificada Ludwig et al. (2009), sendo as sementes imersas em uma suspensão salina (NaCl 0,85 %) dos isolados na concentração  $10^8$  UFC ml<sup>-1</sup> ( $A_{540}=0,5$ ), e mantidas sob agitação constante durante 30 minutos a 50 rpm. A testemunha correspondeu a sementes imersas apenas em solução salina. Após o tratamento, as sementes foram distribuídas em placas de Petri contendo meio BDA e incubadas durante sete dias em BOD a 25±2° C e fotoperíodo de 12 h. Decorrido o período de incubação, avaliou-se a incidência de fungos detectados nas sementes e calculado o percentual de controle e de germinação das sementes de cada tratamento. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com seis tratamentos e cinco repetições, com 20 sementes cada.

#### *Análise estatística*

Os dados obtidos nos experimentos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e ao teste Tukey ( $P < 0,05$ ). Quando necessário os dados foram transformados em  $\log_{10}(x+1)$ , para homogeneização e normalização da amostra. As análises estatísticas foram efetuadas por meio do software R v. 4.0.4. (R Core Team, 2021).

## **Resultados e Discussão**

#### *Qualidade sanitária das sementes de alface*

A espécie fúngica de maior incidência na avaliação da qualidade sanitária das sementes de alface cultivar ‘Simpson’ foi *Aspergillus fumigatus* Fresenius (74 %), seguida por *Chaetomium globosum* Kunze (12 %) e *Aspergillus niger* van Tieghem (12 %). Os percentuais de sementes contaminadas e germinadas observado foram 2 % e 81 %, respectivamente (Tabela 1).

**Tabela 1.** Percentual de incidência de patógenos e germinação de sementes de alface cv. ‘Simpson’ por meio do *Blotter Test*.

Incidência de Fungos (%)	Cultivar 'Simpson'
<i>Aspergillus fumigatus</i>	74
<i>A niger</i>	12
<i>Chaetomium globosum</i>	12
<i>Cladosporium</i> sp.	2
Germinadas	81
Não germinadas	19
Sadias	98
Contaminadas	2

Fonte: Dados da pesquisa.

Apesar da baixa incidência da *C. globosum* detectada neste estudo, esta espécie pode assumir grande importância como contaminante de sementes, conforme observado por Costa et al. (2021), que verificaram um alto percentual de *C. globosum* associado a sementes de alface cultivares ‘Grandes Lagos Americana’ (40 %) e ‘Americana Delícia’ (71 %).

Os resultados encontrados corroboram com os de Paiva et al. (2016) que também observaram uma alta incidência de *Aspergillus* spp. ao avaliarem a qualidade sanitárias de diferentes lotes de sementes de alface cv. ‘Simpson’. Lima et al. (2020) também detectaram a alta incidência de *Aspergillus* spp. associados a diferentes lotes de sementes de alface cresspa, e uma baixa incidência de *Cladosporium* spp. e *Alternaria* spp.

Os gêneros *Aspergillus* e *Cladosporium* são frequentemente encontrados em ambientes de armazenamento, podendo ocasionar desuniformidade da germinação e morte do embrião das sementes (Bhajibhuje, 2014; Machado, 2012).

As sementes são consideradas o principal e mais eficiente veículo de disseminação de patógenos, que podem ser transportados aderidos à superfície da semente ou no seu interior. Por esta razão, a avaliação sanitária das sementes é de grande importância, pois possibilita a identificação de problemas ocorridos no campo e durante o armazenamento, e estabelecer métodos de controle dos patógenos associados as sementes, evitando assim a introdução desses patógenos em novas áreas (Flávio et al., 2014; Lopes & Nascimento, 2009).

#### *Tratamento térmico das sementes de alface*

As médias de incidência dos fungos *Aspergillus flavus* Link, *A. fumigatus*, *A. niger* e *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill diferiram significativamente entre os tratamentos (Tabela 2). Os tratamentos térmicos a 48° C/ 25 min e 51° C/ 30 min foram os mais eficientes no controle de fungos fitopatogênicos associados às sementes de alface cultivar ‘Simpson’. Apesar da maioria dos tratamentos terem sido capazes de promover uma redução significativa dos fungos associados a estas sementes, o tratamento térmico a 45° C/ 25 min., não foi capaz

de controlar o fungo *A. niger*, cuja incidência foi maior que no tratamento testemunha. A 48° C/ 30 min, o percentual de controle de *A. niger* também foi baixo (28 %) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Médias de incidência e controle (%) de fungos fitopatogênicos associados às sementes de alface cv. ‘Simpson’ após a tratamento térmico.

Incidência (média n° Colônia)	Test.	Tratamentos						P-value	
		45° C		48° C		51° C			
		25 min	30 min	25 min	30 min	25 min	30 min		
<i>Aspergillus</i> sp.	INC	1,20 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,40 a	0,00 a	0,00 a	0,509
	Ctr (%)		100	100	100	67	100	100	
<i>A. fumigatus</i>	INC	3,00 a	0,80 ab	0,40 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,006**
	Ctr (%)		93	87	100	100	100	100	
<i>A. flavus</i>	INC	3,80 a	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,80 b	0,80 b	0,00 b	<0,001 ***
	Ctr (%)		100	100	100	79	79	100	
<i>A. niger</i>	INC	5,00 b	16,60 a	0,00 b	0,00 b	3,60 b	0,20 b	0,40 b	<0,001 ***
	Ctr (%)		NC	100	100	28	96	92	
<i>Curvularia lunata</i>	INC	2,20 a	0,00 a	0,20 a	0,00 a	0,00 a	0,20 a	0,00 a	0,076
	Ctr (%)		100	91	100	100	91	100	
<i>Chaetomium globosum</i>	INC	0,60 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,445
	Ctr (%)		100	100	100	100	100	100	
<i>Rhizopus stolonifer</i>	INC	5,00 a	2,20 ab	0,00 b	0,002**				
	Ctr (%)		56	100	100	100	100	100	

Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem significativamente entre si teste Tukey (\* =  $P < 0,05$ ; \*\* =  $P < 0,01$ ; \*\*\* =  $P < 0,001$ ). Test = testemunha; INC = incidência; Ctr (%) = percentual de controle; NC = não controlou.

Essa dificuldade de controle em relação ao gênero *Aspergillus*, também foi observada por Silva et al. (2021) que verificaram que o tratamento térmico de sementes de alface cv. ‘Mimosa’ a 49° C durante 30 minutos erradicou *Alternaria* sp. e *Phoma* sp., porém favoreceu o desenvolvimento de *Aspergillus* spp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp. e *Cladosporium* sp., quando comparados ao controle.

Cunha et al. (2017) também observaram que a termoterapia de sementes de abóbora (*Cucurbita pepo* L.), promoveu uma maior incidência de *Aspergillus* sp. com o aumento da temperatura, porém houve uma redução da incidência em relação ao período de exposição. Segundo esses autores, o aumento da temperatura proporcionou uma redução da competição com fungos de crescimento rápido, fazendo assim com que a incidência de *Aspergillus* sp. fosse maior com o aumento da temperatura.

Braga et al. (2010) conseguiram erradicar *Rhizopus* sp. após submeter sementes de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) a 55° C por 30 minutos. Já no presente estudo, esta espécie fúngica foi controlada 100 % por quase todos os tratamentos, com exceção de 45° C/ 25 min, cujo controle foi de apenas 56 %, o mesmo visto por Dourado et al. (2020) que também obteve

bons resultados no controle de fungos associados às sementes de pimentão (*Capsicum annum* L.) por meio da termoterapia.

O tratamento térmico de sementes é um dos métodos de controle mais utilizados. A temperatura da água deve estar entre 45° C e 60° C, independentemente da espécie vegetal, por no máximo 60 minutos, sendo que a combinação de temperatura e calor irá variar entre as espécies, cultivares e até mesmo lotes de sementes (Braga et al., 2010). Outros fatores que podem afetar a eficácia do tratamento térmico são a idade da semente, dormência, características físicas e fisiológicas, e tipo de patógeno (Pereira et al., 2015).

Os percentuais de germinação das sementes após o tratamento térmico variaram de 96 % a 71 %, sendo o tratamento 51° C/ 30 min o que apresentou maior interferência sobre a qualidade fisiológica das sementes de alface, com menor número de sementes germinadas (Tabela 3).

**Tabela 3.** Efeito do tratamento térmico na germinação de sementes de alface cv. 'Simpson'.

Tratamentos	Germinação (%)
Testemunha	92
45° C/ 25 min	89
45° C/ 30 min	96
48° C/ 25 min	92
48° C/ 30 min	93
51° C/ 25 min	86
51° C/ 30 min	71

Silva et al. (2021) demonstrou que o tratamento térmico de sementes de alface (49° C/30 min) promoveu um aumento da porcentagem de sementes germinadas e a acelerou a formação de plântulas normais quando comparado ao controle. A imersão das sementes em água quente modifica a permeabilidade do tegumento, estimulando a germinação, em razão de potencializar a absorção de água pela semente, resultando na quebra da rigidez do tegumento quando combinada a ação do calor e o tempo de exposição (Vazquez-Yanes, 1975; Martins et al., 2011).

A maioria das hortaliças não dispõem de produtos químicos registrados para o tratamento de semente, desta forma a termoterapia é um tratamento alternativo, de baixo custo e sem efeito residual, eficaz na erradicação de patógenos associados às sementes (Pereira et al., 2015).

*Tratamento biológico de sementes de alface com isolados de Bacillus spp.*

O controle biológico das sementes de alface cultivar ‘Simpson’ com isolados de *Bacillus* spp. reduziu a maioria das espécies fúngicas detectadas no tratamento testemunha. As médias de incidência de *Aspergillus* sp., *A. fumigatus*, *A. niger* e *R. stolonifer* após a microbiolização, diferiram significativamente da testemunha (Tabela 4).

**Tabela 4.** Incidência e controle (%) de fungos fitopatogênicos associados às sementes de alface cv. ‘Simpson’ após a tratamento biológico com isolados de *Bacillus* spp.

Incidência (média n° Colônia)	Test.	Tratamentos					P-value	
		MGSS B271	MGSS B272	MGSS B273	MGSS B274	MGSS B275		
<i>Aspergillus</i> sp.	INC	6,00 a	0,00 b	0,20 b	0,00 b	0,40 b	0,00 b	<0,001***
	Ctr (%)		100	97	100	93	100	
<i>A. flavus</i>	INC	2,00 a	0,00 a	0,059				
	Ctr (%)		100	100	100	100	100	
<i>A. fumigatus</i>	INC	2,00 a	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,002**
	Ctr (%)		100	100	100	100	100	
<i>A. niger</i>	INC	6,40 a	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b	<0,001***
	Ctr (%)		100	100	100	100	100	
<i>Curvularia lunata</i>	INC	1,00 a	0,00 a	0,051				
	Ctr (%)		100	100	100	100	100	
<i>Trichoderma</i> sp.	INC	0,20 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,20 a	0,00 a	0,561
	Ctr (%)		100	100	100	NC	100	
<i>Rhizopus stolonifer</i>	INC	4,80 a	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,002**
	Ctr (%)		100	100	100	100	100	

Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey (\* =  $P < 0,05$ ; \*\* =  $P < 0,01$ ; \*\*\* =  $P < 0,001$ ). Test = testemunha; MGSS B271, MGSS B272 e MGSS B273 = *B. methylotrophicus*; MGSS B274 = *B. amyloliquefaciens*; MGSS B275 = *B. thuringiensis*; INC = incidência; Ctr (%) = percentual de controle; NC = não controlou.

Os isolados MGSS B271, MGSS B273 (*B. methylotrophicus*) e MGSS B275 (*B. thuringiensis*) foram os mais eficientes no controle dos fungos fitopatogênicos associados as sementes, erradicando 100 % para todos os patógenos. E, de forma geral, com exceção de *Trichoderma* sp., que foi o único patógeno não controlado no tratamento com o isolado MGSS B274 (*B. amyloliquefaciens*), todos os isolados testados obtiveram bons resultados no controle das espécies fúngicas, com percentual de controle variando de 93 a 100 %, (Tabela 4).

O ótimo desempenho dos isolados de *B. methylotrophicus* se justifica pelo fato dessa espécie produzir antibióticos lipopeptídeos, como a surfactina, fengicina, iturina, micosubtilina e bacilomicina (Frikha-Gargouri et al., 2017; Mehta et al., 2014). Shan et al. (2013) observaram que o crescimento de diversos fungos fitopatogênicos foi inibido por *B. methylotrophicus*, sendo identificado o ácido phenaminomethylacetic como a substância responsável por esse efeito. Resultados semelhantes ao deste estudo foram obtidos por Costa et al. (2021), que verificaram que os tratamentos de sementes de alface com isolados de *B.*

*methylophilicus* e *B. thuringiensis* foram eficazes no controle de fungos associados às sementes dessa hortaliça.

A espécie *B. thuringiensis* tem sido intensamente estudada como agente biocontrolador de insetos de importância agrícola, por meio da produção de proteínas Cry ou  $\delta$ -endotoxinas (Zhou et al., 2008). Essa espécie bacteriana também tem sido empregada no controle de doenças de plantas, devido a produção de antibióticos como a zwittermicin A, e lactonas N-acil-homoserina (AHC) que são moléculas sinalizadores envolvidas na detecção do *quorum sensing* bacteriano (Silo-Suh et al., 1994; Dong et al., 2002).

Batista Junior et al. (2002) verificou o efeito antifúngico *in vitro* de *B. thuringiensis* sobre o crescimento micelial de *Fusarium* spp. e *Colletotrichum* sp. O importante papel de *Bacillus* spp., também tem sido observado por meio do tratamento de sementes de hortaliças como pimentão (Dourado et al., 2020), tomate (Silva, 2015), quiabo (Silva, 2020), no controle de patógenos transmitidos por essas sementes.

O gênero *Bacillus* é composto por bactérias gram-positivas, formadoras de endósporos, aeróbicas ou anaeróbicas facultativas, sendo de grande interesse e aplicabilidade na agricultura devido a sua grande diversidade e abundância (Villarreal-Delgado et al., 2017). Diversos estudos têm demonstrado o potencial biocontrolador de diversas espécies do gênero *Bacillus* contra diversos tipos de fitopatógenos (Li et al., 2015; Nascimento et al., 2020; Arguelles-Arias et al., 2009). Os principais mecanismos de ação de *Bacillus* spp., que atuam evitando o desenvolvimento e estabelecimento dos fitopatógenos, são antibiose, competição, indução de resistência, sideróforos, toxinas e enzimas líticas, além de serem promotores de crescimento da planta (Tejera-Hernández et al., 2011; Ramamoorthy et al., 2001).

O biocontrole das sementes de alface cultivar ‘Simpson’ com os isolados de *Bacillus* spp. não exerceu efeito sobre a germinação das mesmas, em que os percentuais dos tratamentos com os isolados variaram de 92 a 98 %. Já na testemunha, 95 % das sementes germinaram (Tabela 5).

**Tabela 5.** Efeito do tratamento biológico com isolados de *Bacillus* spp. na germinação de sementes de alface cv. ‘Simpson’.

Tratamentos	Germinação (%)
Testemunha	95
MGSS B271	92
MGSS B272	98
MGSS B273	94
MGSS B274	90
MGSS B275	93

MGSS B271, MGSS B272 e MGSS B273 = *B. methylophilicus*;  
MGSS B274 = *B. amyloliquefaciens*; MGSS B275 = *B. thuringiensis*.

O emprego de espécies de *Bacillus* no controle de doenças é vantajoso devido a sua eficiência, praticidade, custo relativamente baixo, garante a sustentabilidade do ambiente, além do fato desse microrganismo ser cosmopolita e facilmente multiplicado (Tejera et al., 2012; Shafi et al., 2017). Todos esses atributos fazem do gênero *Bacillus*, o ingrediente ativo da maioria dos produtos biológicos comercializados no mundo (Dorighello, 2017), sendo indicado também no tratamento sanitário das sementes, que são consideradas um dos mais importantes insumos agrícolas.

## Conclusões

O tratamento de sementes por meio da termoterapia ou com isolados de *Bacillus* spp. é uma alternativa promissora para o controle de fungos fitopatogênicos transmitidos pelas sementes de alface, sendo recomendado a utilização desses tratamentos no manejo integrado de doenças na cultura da alface.

## REFERÊNCIAS

- Arguelles-Arias, A. (2009). *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microbial Cell Factories*, v. 8, n. 63, 1-12.
- Barnett, H. L. (1972). *Illustrated genera of imperfect fungi*. 3rd Edition. Minneapolis: Burgess Publications Co.
- Batista Junior, C. B. (2014). Efeito fungistático de *Bacillus thuringiensis* e de outras bactérias sobre alguns fungos fitopatogênicos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 37, n. 8, p. 1189-1194.
- Bhajibhuje, M. N. (2014). Seasonal diversity of seed borne micro-fungal flora in storage on Solanum melongena L. *International Journal of Life Sciences*, v. 2, n. 1, p. 31-43.
- Braga, M. P. (2010). Relações entre tratamento térmico, germinação, vigor e sanidade de sementes de tomate. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 32, n. 1, p. 101-110.
- Costa, N. J. F. (2021). Microbiolização de sementes de alface com *Bacillus* spp. para controle de fungos fitopatogênicos. *Anais da Academia Pernambucana de Ciências Agronômicas*, v. 18, n. 1, p. 1-14.
- Cunha, R. P. (2017). Termoterapia no controle de patógenos associados às sementes de abóbora. *Tecnologia & Ciência Agropecuária*, v. 11, n. 2, p: 53 – 57.
- Diniz, K. A. (2009). Sweet pepper seed responses to inoculation with microorganisms and coating with micronutrients, aminoacids and plant growth regulators. *Scientia Agricola*, v. 66, n. 3, p. 293-297.
- Dong, Y. (2002). Identification of quorum-quenching N-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, n. 4, p. 1754-1759.
- Dorighello, D. V. (2017). *Versatilidade de Bacillus spp. no controle biológico de doenças de plantas e na promoção de crescimento de soja*. Tese (Doutorado em Agronomia), Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP.
- Dourado, G. F. (2020). Alternative seed treatment methods for plant pathogen control in sweet pepper crops. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, v. 15, n. 3, p. 1-10.
- Ellis, M. B. (1971). *Dematiaceous Hypomycetes*. Surrey: Commonwealth Mycological Institute.
- Françoso, C. B; Barbedo, C. J. (2014). Tratamentos osmóticos e térmicos para controle de fungos em sementes de grumixameira (*Eugenia brasiliensis* Lam.) e pitangueira (*Eugenia uniflora* L.). *Hoehnea*, v. 41, n. 4, p. 541-552.
- Frikha- Gargouri, O. (2017). Lipopeptides from a novel *Bacillus methylotrophicus* 39b strain suppress agrobacterium crown gall tumours on tomato plants. *Pest Management Science*, v. 73, n. 3, p. 568-574.
- Lima, C. B. (2020). Ocorrência de microrganismos e sua relação com a qualidade fisiológica de sementes de alface. *Brazilian Journal of Development*, v. 6, n. 11, p. 90053-90067.

- Li, Y. (2015). Biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* LJ02 induces systemic resistance against cucurbits powdery mildew. *Frontiers Microbiology*, v. 6, n. 883, p. 1-15.
- Ludwig, J. (2009). Microbiolização de sementes para o controle da mancha-parda e da escaldadura em arroz irrigado. *Tropical Plant Pathology*, v. 34, n. 5, p. 322-328.
- Machado, J. C. (2006). Tratamento de sementes no controle de fitopatógenos e pragas. *Informe Agropecuário*, v. 27, n. 232, p. 76-87.
- Machado, J. C. (2012). Patologia de sementes: significado e atribuições. In: Carvalho, N. M., Nakagawa, J. *Sementes: ciência, tecnologia e produção*. Jaboticabal: Funep, p. 524-590, 2012.
- Maguire, J. D. (1962). Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*, v.2, n.2, p.176-177.
- Martins, C. A. S. (2011). Pre-germinative treatments in okra seeds in different stadiums of fruit maturation. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 32, n. 4, p. 1759-177.
- Matos, N. C. S. (2018). Produção sustentável de alimentos e educação: uma relação essencial. *Revista Educação Ambiental em Ação*, v. XVII, n. 65, p. 1-4.
- Mehta, P. (2014). Tricalcium phosphate solubilisation by new endophyte *Bacillus methylotrophicus* CKAM isolated from apple root endosphere and its plant growth-promoting activities. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 36, p. 2033-2045.
- Nagarajkumar, M. (2004). Involvement of secondary metabolites and extracellular lytic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* in inhibition of *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen. *Microbiological Research*, v. 159, n. 1, p. 73-81.
- Nascimento, I. O. (2020). Microbiolização de sementes de arroz com *Bacillus* spp. na redução de patógenos. *Research, Society and Development*, v. 9, n. 10, p. 1-21.
- Nascimento, W. M. (2011). Qualidade da semente e estabelecimento de plantas de hortaliças no campo. In: Nascimento, W. M. *Hortaliças: tecnologia de produção de sementes*. Brasília: Embrapa Hortaliças, p. 79-106.
- Paiva, C. T. C. (2016). Qualidade fisiológica e sanitária de sementes comerciais de alface e repolho. *Revista de Ciências Agroambientais*, v. 14, n. 1, p. 53-59.
- Pedroso, D. C. (2009). Associação de *Alternaria* spp. com sementes de Apiáceas: métodos de inoculação e influência na qualidade fisiológica. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS.
- Pedroso, D. C. (2018). Tratamento químico e biológico: qualidade fisiológica e sanitária de sementes de cenoura durante o armazenamento. *Pesquisa Agropecuária Pernambucana*, v. 23, n. 1, p. 1-9.
- Pereira, R. B. (2015). Tratamento de Sementes de Hortaliças. Brasília: Embrapa Hortaliças. (Circular Técnica, n. 140)
- Ramamoorthy, V. (2001). Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Protection*, v. 10, p. 1-11.
- Core T. R. (2021). A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. 2021. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em: 20 jul.
- Santos, L. A. (2016). Radioterapia e termoterapia como tratamentos de sementes de soja. *Brazilian Journal of Applied Technology for Agricultural Science*, v. 9, n. 2, p. 37-44.
- Shafi, J. (2017). *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, v. 31, n. 3, p. 446-459.
- Shan, H. (2013). Biocontrol of rice blast by the phenaminomethylacetic acid producer of *Bacillus methylotrophicus* strain BC79. *Crop Protection*, v. 44, p. 29-37.
- Silo-Suh, L. A. (1994). Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 6, n. 6, p. 2023-2030.
- Silva, A. C. (2021). Potencial fisiológico de sementes de alface submetidas a diferentes tratamentos físicos para controle de patógenos. *Revista de Ciências Agrárias*, v. 44, n. 1, p. 35-42.
- Silva, M. G. N. (2020). Extratos vegetais de angico e pau-ferro no controle de fitopatógenos e na fisiologia de sementes de soja. *Brazilian Journal of Development*, v. 6, n. 8, p. 63012-63024.
- Silva, M. S. B. S. (2015). Manejo ecológico de fitopatógenos em sementes de tomate. Dissertação (Mestrado em Agroecologia), Universidade Estadual do Maranhão, São Luís-MA, 2015.
- Silva, M. S. B. S. (2020). Manejo ecológico de fitopatógenos em sementes de quiabo. Tese (Doutorado em Agroecologia), Universidade Estadual do Maranhão, São Luís-MA.
- Tejera, B. (2021). Antagonismo de *Bacillus* spp. frente a hongos fitopatógenos del cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Revista de Protección Vegetal*, v. 27, n. 2, p. 117-122.
- Tejera-Hernández, B. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, v. 42, n. 3, p. 131-138.

- Vazquez-Yanes, C. (1975). The use of a thermogradient bar in the study of seed germination in *Ochroma lagopus* SW. *Turrialba*, v. 25, n. 3, p. 328-330.
- Villarreal-Delgado, M. F. (2017). The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. *Revista Mexicana de Fitopatología*, v. 36, n. 1, p. 95-130.
- Zhou, Y. (2008). Novel roles of *Bacillus thuringiensis* to control plant diseases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 80, p. 563-572.