

MARIANE PEREIRA RICETO

**CONTROLE BIOLÓGICO DE *Alternaria dauci* COM *Bacillus pumilus* E
Bacillus subtilis EM SEMENTES DE CENOURA**

Botucatu

2021

MARIANE PEREIRA RICETO

**CONTROLE BIOLÓGICO DE *Alternaria dauci* COM *Bacillus pumilus* E
Bacillus subtilis EM SEMENTES DE CENOURA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da Unesp Câmpus de Botucatu, para
a obtenção do título de Mestre em Agronomia
(Proteção de Plantas).

Orientadora: Profa Dra. Adriana Zanin Kronka

Botucatu

2021

R497c Riceto, Mariane Pereira
Controle biológico de *Alternaria dauci* com *Bacillus pumilus* e
Bacillus subtilis em sementes de cenoura / Mariane Pereira
Riceto. -- Botucatu, 2021
46 p. : tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
(Unesp), Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu
Orientadora: Adriana Zanin Kronka

1. Controle alternativo. 2. Microbiolização de sementes. 3.
Patologia de sementes. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da
Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor (a).

Essa ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: CONTROLE BIOLÓGICO DE *Alternaria dauci* COM
Bacillus pumilus E *Bacillus subtilis* EM SEMENTES DE
CENOURA

AUTORA: MARIANE PEREIRA RICETO
ORIENTADORA: ADRIANA ZANIN KRONKA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em
AGRONOMIA (PROTEÇÃO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:

Prof. ^a Dr. ^a ADRIANA ZANIN KRONKA (Participação Virtual)
Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agronômicas de
Botucatu UNESP



Dr. JOSÉ MARCELO SOMAN (Participação Virtual)
Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agronômicas de
Botucatu - UNESP



Pesquisadora Dr. ^a ALESSANDRA KEIKO NAKASONE
(Participação Virtual) Embrapa Amazônia Oriental / Embrapa



Botucatu, 16 de dezembro de 2021

*À Eliane (in memoriam) e à Iracy (in memoriam), que me
ensinaram que todas as mulheres escrevem a própria
história, mesmo que neguem a elas o papel
ou a tinta.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao longo dos dois anos nos quais estive ligada ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Proteção Vegetal, muitos foram os que se dispuseram a me auxiliar neste trabalho. Agradecer a todos é, para mim, uma alegre tarefa, pois me sinto afortunada por ter contato com tantas instâncias de apoio. Agradeço primeiramente à causa primária de todas as coisas, ponto de partida de tudo, fonte de amor inesgotável. Obrigada Deus, pela oportunidade da vida, da capacidade de raciocínio, aprendizado e proteção.

Agradeço à minha família pela compreensão e apoio, em especial, agradeço à amada Eliane (*in memoriam*), minha mãe, e à Iracy (*in memoriam*), minha avó, por me ensinarem o significado da palavra amor. Obrigada por todo carinho e dedicação.

À minha fantástica irmã, Maíra pela amizade, companheirismo, acolhimento e por ser meu sol em dias nublados. Obrigada por estar comigo em qualquer circunstância. De fato fomos, somos e seremos sempre muito fortes.

Ao meu pai Mauro (*in memoriam*), suas bençãos, proteção, cuidado e carinho acalantam meu coração. Obrigada por tanto.

Ao José pela inacreditável paciência nos meus momentos de desespero, pelo amor e carinho presentes há tantos anos. Obrigada por oferecer a dádiva de partilhar a vida e de tentar crescer em conjunto.

À destemida Alice, minha filha, combustível que alimenta a minha alma e que enche meu coração de alegria. Te amar tornou tudo mais leve, espero que saiba que este trabalho tem muito de você.

À Malu, Nalu e Lessa agradeço a amizade. A maior parte da minha vida foi dividida com vocês. Risadas, lágrimas, dramas, derrotas e vitórias que quando compartilhadas são mais fáceis de serem carregadas.

Aos colegas do Departamento de Proteção Vegetal, Rosicléia Silva e Luana Laurindo pelos momentos de descontração e ajuda. Em especial, agradeço à Larissa Moreira, pela parceria, dedicação, amizade e auxílio em todas as etapas da execução desde trabalho.

À Prof^a Dra. Natascha Almeida Marques pela amizade, conselhos, pelo grande apoio profissional e pessoal, e disposição em ajudar-me na estatística deste trabalho.

À Prof^a Dra. Adriana Zanin Kronka pelas instruções, compreensão e conselhos, úteis para o meu progresso pessoal e profissional e término desta dissertação.

Ao técnico do Departamento de Proteção Vegetal Marcelo, pelo auxílio na calibração das bactérias.

A todos os membros da banca pelas contribuições dadas a este trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil – CAPES – Código de financiamento 001.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” (UNESP) e à Faculdade de Ciências Agronômicas - Câmpus de Botucatu pela possibilidade de realizar este curso.

E finalmente, aqui fica a minha especial e profunda gratidão às pessoas que ajudaram, conscientes ou não, com a realização deste curso.

RESUMO

A queima-das-folhas na cultura da cenoura pode ser causada por um complexo etiológico, entre os quais se destaca o fungo *A. dauci*. Este patógeno é transmitido por sementes infectadas, podendo reduzir a germinação e vigor, ressaltando a importância da utilização de sementes isentas deste fungo. O gênero *Bacillus* tem sido investigado pela sua habilidade de controlar fitopatógenos, característica concedida principalmente ao mecanismo de antibiose. Seu emprego possui o intuito de minimizar os efeitos negativos do uso de produtos químicos e aumentar a produção de alimentos de melhor qualidade, propiciando, assim, o desenvolvimento de uma agricultura alternativa e/ou sustentável. Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo verificar a viabilidade do emprego das bactérias *B. pumilus* e *B. subtilis* como alternativa de controle de *A. dauci* em sementes de cenoura, avaliando a ação *in vitro* destas antagonistas sobre o patógeno e os efeitos de seu emprego no tratamento das sementes sobre a qualidade sanitária e fisiológica das sementes tratadas, e no desenvolvimento inicial das plântulas. Inicialmente, foi avaliado o efeito *in vitro* de *B. subtilis* (linhagem QST 713) e *B. pumilus* (linhagem QST 2808) sobre o *A. dauci* por meio do teste de pareamento em meio de cultura, em placas de Petri. Em seguida, sementes de cenoura cultivar Brasília foram tratadas com as espécies de *Bacillus*, para averiguar o efeito dos antagonistas *in vivo*. Sementes tratadas com fungicida à base de ditiocarbamato, sementes inoculadas não tratadas e sementes não inoculadas não tratadas compuseram os demais tratamentos. Após os tratamentos, as sementes foram avaliadas quanto à qualidade sanitária, pelo método do papel filtro, e ao potencial fisiológico pelos testes de primeira contagem de germinação (PCG - vigor) e germinação (G). Para avaliar o efeito dos tratamentos no desenvolvimento das plântulas, em casa-de-vegetação, foram avaliados o índice de velocidade de emergência (IVE), comprimento de raiz e de parte aérea, e massa fresca e seca de raiz e parte aérea. No teste *in vitro*, não houve diferença estatística entre os tratamentos para a formação do halo de inibição, mostrando que os isolados de *B. subtilis* e *B. pumilus* empregados têm pouco e/ou nenhum efeito antagonista contra *A. dauci*. O tratamento biológico com *B. subtilis* e *B. pumilus* diminuiu a incidência do patógeno nas sementes de cenoura. Com relação à qualidade fisiológica, *B. subtilis* não interferiu na germinação e vigor (PCG) das sementes, mas *B. pumilus* apresentou efeitos distintos sobre estas variáveis nos dois ensaios, interferindo negativamente na

PCG e germinação no primeiro ensaio. O tratamento biológico das sementes não interferiu no desenvolvimento das plântulas nos experimentos em casa-de-vegetação. Os resultados indicam que *B. subtilis* tem potencial de emprego no manejo de *A. dauci* nas sementes de cenoura. Embora *B. pumilus* tenha sido eficiente na redução do patógeno nas sementes, os efeitos deste antagonista na germinação e vigor sugerem a necessidade de mais investigações para a sua recomendação na microbiolização de sementes de cenoura.

Palavras-chave: controle alternativo, *Daucus carota*, microbiolização de sementes, patologia de sementes, queima-das-folhas da cenoura.

ABSTRACT

Carrots leaf blight can be caused by an etiological complex, which includes *Alternaria dauci* fungus. Infected seeds transmit this pathogen, which can reduce germination and vigor, highlighting the importance of using seeds free of this fungus. The genus *Bacillus* has been investigated for its ability to control phytopathogens, a characteristic attributed mainly to the mechanism of antibiosis. Its use seeks to minimize the negative effects of chemical products and increase the production of better quality food, thus providing the development of an alternative and/or sustainable agriculture. Regarding the aforementioned, the present study aimed to verify the use of *B. pumilus* and *B. subtilis* as an alternative to control *A. dauci* in carrot seeds, by the evaluation of those antagonists *in vitro* action on the pathogen, the effects of their use in seed treatments on the sanitary and physiological quality of the treated seeds, and on the initial development of the seedlings. Initially, the *in vitro* effects of *B. subtilis* (QST 713 strain) and *B. pumilus* (QST 2808 strain) on *A. dauci* were evaluated through the pairing test in culture medium, in Petri dishes. Then, cultivar Brasília carrot seeds were treated with *Bacillus* species, to investigate the effect of antagonists *in vivo*. Seeds treated with a dithiocarbamate-based fungicide, untreated inoculated seeds and untreated uninoculated seeds composed the other treatments. After the treatments, seeds were evaluated for sanitary quality, with the filter paper method, and for the physiological potential, with the first germination count (PCG - vigor) and germination (G) tests. In order to evaluate the treatments effect on seedling development, emergence speed index (IVE), root and shoot length, as well as root and shoot fresh and dry mass were evaluated in greenhouse experiments. There was no statistical difference between the treatments for the inhibition halo in *in vitro* tests, showing that the *B. subtilis* and *B. pumilus* isolates tested have little and/or no antagonistic effect against *A. dauci*. Biological treatment with *B. subtilis* and *B. pumilus* reduced the incidence of the pathogen on carrot seeds. Concerning seeds physiological quality, *B. subtilis* did not interfere with seeds germination and vigor (PCG), but *B. pumilus* had different effects on these variables in the two assays, presenting negative interference on PCG and germination in the first assay. The biological treatment of the seeds did not interfere in seedlings development in greenhouse experiments. The results indicate that *B. subtilis* has potential for use in the management of *A. dauci* in carrot seeds. Although *B. pumilus* was efficient in reducing the pathogen incidence in seeds, the effects of this

antagonist on germination and vigor suggest that further investigations are necessary for its recommendation in carrot seeds microbiolization.

Keywords: alternative control, *Daucus carota*, seed microbiolization, seed pathology, carrot leaf blight.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	A cultura da cenoura (<i>Daucus carota</i> L.)	17
2.2	Doença queima-das-folhas em cenoura.....	19
2.3	Controle biológico de doenças de plantas	20
3	MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1	Efeito <i>in vitro</i> de <i>B. subtilis</i>, <i>B. pumilus</i> sobre <i>A. dauci</i>.....	25
3.1.1	Obtenção dos antagonistas <i>B. subtilis</i> , <i>B. pumilus</i> e do isolado de <i>A. dauci</i>	25
3.1.2	Teste de antagonismo direto sobre <i>A. dauci</i>	26
3.2	Efeito de <i>B. subtilis</i> e <i>B. pumilus</i> sobre a qualidade sanitária e fisiológica de sementes de cenoura infectadas por <i>A. dauci</i>.....	27
3.2.1	Obtenção do lote de trabalho e tratamento de sementes com <i>B. subtilis</i> e <i>B. umilus</i>	27
3.2.2	Qualidade sanitária das sementes de cenoura.....	28
3.2.3	Qualidade fisiológica das sementes de cenoura	28
3.2.3.1	Germinação (G) e primeira contagem de germinação (PCG)	29
3.2.3.2	Índice de velocidade de emergência (IVE)	29
3.2.2.3	Comprimento e massa de plântulas	30
3.2.2.4	Delineamento experimental e análise estatística	30
4	RESULTADOS.....	31
4.1	Efeito <i>in vitro</i> de <i>B. subtilis</i> e <i>B. pumilus</i> sobre <i>A. dauci</i>.....	31
4.2	Efeito do tratamento com <i>B. subtilis</i> e <i>B. pumilus</i> sobre a qualidade sanitária das sementes	31
4.3	Efeito do tratamento com <i>B. subtilis</i> e <i>B. pumilus</i> sobre a qualidade fisiológica das sementes	32
4.3.1	Germinação (G) e primeira contagem de germinação (PCG)	32
4.3.2	Índice de velocidade de emergência (IVE)	33
4.3.3	Comprimento e massa de plântulas	34
5	DISCUSSÃO.....	35
6	CONCLUSÕES.....	40
	REFERÊNCIAS.....	41

1 INTRODUÇÃO

A cenoura (*Daucus carota* L.) tem grande relevância socioeconômica para o agronegócio brasileiro, estando entre as cinco hortaliças mais consumidas no Brasil.

A cenoura é uma cultura suscetível ao ataque de doenças fúngicas e bacterianas, dentre as quais se destaca a queima-das-folhas, que pode ser causada pelos fungos *Alternaria dauci* e *Cercospora carotae*, e pela bactéria *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae*. A queima-das-folhas por *Alternaria* ocorre prioritariamente no verão, em épocas mais úmidas e quentes. Por ser a doença que ocorre em quase todo o país, e com patógenos que podem ser disseminados facilmente pelo vento, irrigação e/ou chuva, e sementes, a queima-das-folhas causa grandes danos econômicos, podendo reduzir quase pela metade a produção.

O uso de defensivos agrícolas é o método mais aplicado para controlar a doença. Este método pode ser de difícil aplicação em determinadas fases da cultura e nem sempre oferece bons resultados, apresentando baixa eficiência de alguns ingredientes ativos por resistência do patógeno ou ineficiência de aplicação a depender de fatores como vento e chuva.

Nesse contexto, o controle biológico por microrganismos apresenta-se como uma possibilidade para a diminuição ou eliminação da aplicação de defensivos químicos no controle de fitopatógenos. A diversidade de microrganismos com ação antagônica surge como ferramenta importante para o controle biológico.

O gênero *Bacillus* tem se destacado nas pesquisas por formar endósporo e apresentar variabilidade nos mecanismos de ação para driblar as defesas dos fitopatógenos. O antagonismo pode se apresentar tanto direto com a produção de antibióticos, habilidade de competição por espaço e nutriente, produção de enzimas que degradam os componentes celulares de patógenos, quanto indireto, sendo capaz de trazer benefícios como resistência sistêmica e promoção de crescimento da cultura. Apesar do uso do *Bacillus* trazer diversos benefícios, sua eficiência depende de vários fatores como forma de aplicação e cultura no qual será aplicado. Além disso, poucas espécies desse gênero são registradas para uso comercial.

Diante do exposto, a presente pesquisa visou verificar a viabilidade do emprego das bactérias *B. pumilus* e *B. subtilis* como alternativa de controle de *A. dauci* em sementes de cenoura, avaliando a ação *in vitro* destas antagonistas sobre o patógeno

e os efeitos de seu emprego no tratamento das sementes sobre a qualidade sanitária e fisiológica das sementes tratadas, e no desenvolvimento inicial das plântulas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura da cenoura (*Daucus carota* L.)

A cenoura tem grande destaque na economia do país, sendo considerada a principal hortaliça-raiz na alimentação da população brasileira, por ser rica em vitaminas e sais minerais (PEREIRA, 2013).

Originária da região asiática, a cenoura atualmente é consumida na cor alaranjada e um pouco adocicada (FILGUEIRA, 2000). Antes do processo de domesticação, a cenoura apresentava um sabor amargo, era pequena e pouco palatável, mas, decorridos vários ciclos de plantios, com a ocorrência da domesticação e várias mutações naturais, essa hortaliça tornou-se versátil, com variedades e cores distintas, sabor mais agradável e com diferentes tamanhos e formatos de raízes (STOLARCZYK; JANICK, 2011).

A cenoura é uma hortaliça pertencente à família Apiaceae, estando no grupo das raízes tuberosas. É uma planta herbácea de caule pouco evidente, posicionado no ponto de inserção das folhas. As principais características da cenoura comercial são: raiz tuberosa, lisa, carnuda, reta e sem ramificações, de formato cônico ou cilíndrico (FILGUEIRA, 2000).

Quanto ao aspecto alimentar, é uma importante fonte vegetal de minerais e vitaminas, rica em antioxidantes, fibras, beta caroteno, alfa caroteno e retinol (vitamina A). O beta caroteno é um importante precursor da vitamina A, sendo um dos responsáveis pela cor alaranjada característica da cenoura. Além de ser consumida *in natura*, é empregada como matéria-prima pelas indústrias alimentícias, sendo comercializada na forma processada (seleta de legumes, alimentos infantis e sopas) ou minimamente processada (cubos, mini-cenouras, raladas em rodela) (ALMEIDA, 2009).

A produção mundial de cenoura, em 2019, foi de 44,76 milhões de toneladas cultivadas em 1,13 milhões de hectares. Nesse ano, os maiores produtores mundiais foram: China, Estados Unidos, Rússia, Uzbequistão, Polônia, Reino Unido, França, Japão, Ucrânia e Itália (FAO, 2021).

De acordo com o Anuário Brasileiro de Hort&Fruti 2021 (2021), no último Censo Agropecuário do IBGE (2017), a produção de cenoura no Brasil alcançou

aproximadamente 480 mil toneladas. O País tem cinco regiões identificadas com a produção de cenoura. A maior está localizada em São Gotardo (Minas Gerais), seguida por Marilândia (Paraná), Cristalina (Goiás), Irecê (Bahia) e Caxias do Sul (Rio Grande do Sul), com áreas cultivadas de 7.377 hectares, 1.550 hectares, 1.450 hectares, 1.400 hectares e 1.300 hectares, respectivamente.

A temperatura é um importante fator climático para a produção de raízes. O alongamento das raízes e o desenvolvimento de coloração característica são favorecidos com temperaturas em torno de 10 a 15°C, e para o processo de germinação a temperatura ideal é entre 8 a 35°C, sendo a velocidade e a uniformidade de germinação influenciadas pela temperatura dentro desse intervalo. Na fase vegetativa da cultura, podem ocorrer doenças foliares, favorecidas por umidade relativa do ar alta e temperaturas elevadas (VIEIRA et al., 1999).

Com relação à diversidade de cultivares de cenoura, são encontradas no mercado sementes de Brasília, Alvorada, Planalto, Esplanada, Kuronan, Nova Kuroda, Prima, Nova Carandaí, Nantes, Harumaki Kinko, Gossum, Tropical, Juliana e Invicto (MATOS et al., 2011). Cada cultivar apresenta características típicas quanto ao formato de suas raízes, resistência a doenças e, sobretudo, quanto ao período de implantação da cultura, o que propicia o cultivo de cenoura no ano todo na mesma região, desde que seja adotada a cultivar apropriada às condições climáticas predominantes em cada época (VIEIRA et al., 1999).

O estabelecimento das plântulas em campo depende de vários fatores como germinação e vigor. Essas características estão diretamente relacionadas ao êxito da produtividade de hortaliças, como a cenoura (OLIVEIRA, 2015).

A qualidade das sementes é a soma dos atributos que contribuem para o seu desempenho do armazenamento à germinação (RAMOS et al., 2004). Os componentes da qualidade de semente estão relacionados com aspectos físicos, fisiológicos, genéticos e sanitários, cada qual com sua importância, de acordo com as características e as condições de produção da espécie ou de um lote específico (CARVALHO; FRANÇA NETO; KRZYZANOWSKI, 2006).

2.2 Doença queima-das-folhas em cenoura

No Brasil, existem mais de quinze doenças causadas por vírus, bactérias, fungos e nematoides registradas na cultura da cenoura, dentre as quais, uma minoria é responsável pela maior parte dos danos na cultura (VIEIRA et al., 1999).

Entre as diversas doenças que afetam a cultura da cenoura, a queima-das-folhas possui significativa importância, sendo a doença mais comum e a que mais causa prejuízos econômicos (SILVA JÚNIOR et al., 2020). A queima-das-folhas é a principal doença foliar da cenoura, podendo ser causada pelos fungos *Alternaria dauci*, *Cercospora carotae* e pela bactéria *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae*. Esses patógenos podem ocorrer de forma isolada ou simultaneamente. A identificação dos agentes causadores da queima-das-folhas em condições de campo é dificultada pela similaridade de sintomas causados pelos patógenos do complexo (RODRIGUES, 2017). Em geral, a doença é provocada pelas espécies fúngicas, com destaque para *A. dauci*, sendo a queima de etiologia bacteriana associada a períodos de precipitações elevadas (PEREIRA et al., 2019). Normalmente *A. dauci* produz lesões em folhas mais velhas e causa necrose na borda dos folíolos, e *C. carotae* causa lesões mais individualizadas. Os sintomas causados por *X. hortorum* pv. *carotae* são iguais aos causados pelos fungos, mas é comum uma exsudação sobre as lesões (LOPES; REIFSCHNEIDER; CHARCHAR, 2008).

A. dauci pertence à divisão Ascomycota, classe Dothideomycetes, ordem Pleosporales, família Pleosporaceae (INDEX FUNGORUM, 2019).

Os principais sintomas causados pela *A. dauci*, são pequenas lesões, de forma irregular, coloração marrom escura ou preta, com halos cloróticos, geralmente localizadas nas margens e extremidades foliares. Pode ocorrer o aparecimento de lesões nos pecíolos e inflorescências. Em condições favoráveis, as lesões coalescem, e quando atingem em torno de 40% da área foliar, amarelecem e morrem, ocasionando o sintoma típico da queima. Normalmente, os sintomas foliares se manifestam entre oito a dez dias após a infecção. Em níveis avançados da doença, há destruição de grande parte das folhas (PEREIRA et al., 2019).

A germinação dos conídios de *A. dauci* é influenciada pela temperatura e pelo fotoperíodo, onde os maiores índices de germinação são observados com temperaturas variando de 10 a 35°C, sendo a temperatura ótima 22°C, e o fotoperíodo em torno de 12 horas luz (MARCUIZZO; SANTOS, 2019).

As sementes, quando infectadas por *A. dauci*, podem ser totalmente danificadas, prejudicando a germinação e o vigor. Uma vez presente na semente, esse patógeno pode se manter viável por até seis anos, sobrevivendo até o estabelecimento de uma nova lavoura e início de um novo ciclo da doença (OLIVEIRA, 2015).

O uso de cultivares adaptadas à estação do ano e que possuam resistência à doença é uma das medidas de controle mais recomendadas. As cultivares Brasília, Kuroda, Kuronan, Alvorada, Carandaí, Esplanada, Prima, Tropical e Planalto mostram-se com bom nível de resistência, já as cultivares do grupo Nantes são conceituadas como bastante suscetíveis (MATOS et al., 2011).

Para um manejo adequado da queima-das-folhas, é importante adotar uma ação conjunta de diferentes práticas agrícolas, como a implantação da lavoura com sementes sadias; rotação de culturas por alguns anos, para redução da população do patógeno; adubação adequada, com o intuito de aumentar a resistência da planta à doença; controle da umidade mediante plantio em solos com boa drenagem, com espaçamentos entre linhas maiores, plantio em canteiros elevados e evitar irrigações excessivas. O controle genético é uma boa opção, mas, a aplicação de defensivos agrícolas é o método mais utilizado pela maior parte dos produtores rurais. Porém, esse método nem sempre alcança o resultado esperado, seja pela baixa eficiência de alguns ingredientes ativos ou ineficiência de aplicação (PEREIRA et al., 2019).

2.3 Controle biológico de doenças de plantas

Uma opção para diminuir ou eliminar o uso de defensivos no controle de fitopatógenos é o controle biológico por microrganismos. Várias técnicas foram aprimoradas para analisar a natureza das interações entre os patógenos e outros microrganismos e as plantas, essas interações são fatores componentes do controle biológico (PEREIRA, 2019). Controle biológico é definido como a diminuição da soma de inóculo ou das principais atividades da doença, causada por um patógeno, executada por um ou mais organismos que não o homem (COOK; BAKER, 1983). Desse modo, a eficiência do biocontrole depende das características antagônicas e do mecanismo de ação dos microrganismos empregados (PEREIRA, 2019).

Diversos gêneros de microrganismos como por exemplo *Trichoderma* e *Pseudomonas* são conhecidos pela capacidade de produzir compostos bioativos. Algumas características são essenciais para a obtenção de um bom antagonista,

dentre elas estão: o estabelecimento rápido no meio, sobreviver sob condições extremas e adversas e ser eficiente contra uma vasta gama de patógenos (BETTIOL, 1991).

Outra qualidade importante para a obtenção de um antagonista são os mecanismos de ação que ele utiliza para suprimir o patógeno. Os mecanismos das interações antagônicas são: antibiose (produção de metabólitos que causam um efeito negativo no patógeno), competição (patógeno e antagonista competem por alimento e/ou espaço), parasitismo (o antagonista se nutre das estruturas reprodutivas do patógeno), hipovirulência (introdução de uma linhagem menos patogênica no patógeno), predação (o antagonista obtém alimento a partir de patógenos) e indução de resistência (estimulo dos mecanismos de defesa da planta pela introdução de um organismo não patogênico) (BETTIOL, 1991).

O gênero *Bacillus* se sobressai pela sua habilidade de controlar fitopatógenos, característica atribuída principalmente ao mecanismo de antibiose (CAWOY et al., 2011). *Bacillus* produz antibióticos como bacitracina, polimixina, tirocidina, gramicidina e circulina, que são utilizados em grande escala em diversos setores da indústria (MADIGAN et al., 2016). Este gênero também tem a capacidade de produzir compostos que são indutores de resistência, estimulando a defesa da planta (HENRY; THONART; ONGENA, 2012).

O gênero *Bacillus* faz parte do grupo das bactérias quimiotróficas, gram positivas, cuja principal característica é a produção de endósporos resistentes ao calor. O solo é o maior reservatório de *Bacillus*, que também pode habitar ambientes extremos, como desertos e geleiras (GRIGOLETTI JÚNIOR; SANTOS; AUER, 2000).

Na agricultura, espécies de *Bacillus* têm sido utilizadas para aumentar a resistência de plantas a diversos estresses ambientais, atuando como promotores de crescimento e como agentes de biocontrole contra doenças e pragas (CLEMENTE et al., 2016).

A espécie *Bacillus subtilis* está entre os antagonistas mais estudados. O antagonismo direto realizado por *B. subtilis* contra fitopatógenos abrange os mecanismos de antibiose (síntese de substâncias antimicrobianas), a competição por espaço e nutrientes, e a síntese de compostos voláteis (LEELASUPHAKUL, 2008). Zhao, Ran e Wang (2013) verificaram a produção dos lipopeptídeos iturina A e surfactina por *B. subtilis* na rizosfera, com a avaliação de um fertilizante à base de esterco de porco fortificado com uma cepa antagônica de *B. subtilis* (Y-IVI) para

controlar a doença de murcha causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* em melões. Dessa forma, esses autores concluíram que a eficácia do biocontrole foi devido à colonização efetiva de *B. subtilis* (Y-IVI) na rizosfera e nos brotos de melão no estágio inicial da doença, também foi observada a produção de lipopeptídeos antifúngico de iturina A e a formação de biofilme que contribuiu para a redução da doença.

Zhang e Xue (2010) avaliaram a eficácia de suspensões de células, filtrados de cultura livres de células e culturas líquidas de *B. subtilis* cepa SB24 para a supressão do mofo branco, causado por *Sclerotinia sclerotiorum*, em plantas de soja, e concluíram que as três preparações na concentração de 5×10^8 UFC mL reduziram a severidade da doença em 60 a 90%, e houve a diminuição da severidade quando as preparações foram aplicadas 24 horas antes da inoculação da planta com *S. sclerotiorum*, mostrando efeitos melhores na proteção preventiva do que na ação após a infecção do patógeno.

Braga Júnior et al. (2017) avaliaram a potencialidade antagonista de sete isolados de *B. subtilis* aos fungos fitopatogênicos *Fusarium subglutinans*, *Curvularia lunata* e *Bipolaris* spp. *in vitro* utilizando as técnicas: cultura fúngica sobre cultura antagonista, pareamento com risco no centro da placa e técnica de círculo, pareamento direto, e concluíram que os isolados UFTBs 03, UFTBs 05, UFTBs 06 e UFTBs 07 foram eficientes na inibição de crescimento micelial dos fungos patogênicos, quando avaliados pelos métodos de círculo e o de cultura fúngica sobre cultura antagonista, tendo a maior porcentagem de inibição de crescimento micelial.

Pershakova et al. (2018) investigaram as propriedades *in vitro* e *in vivo* de três linhagens de *B. subtilis* no controle dos fungos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Alternaria radicina* e *Erwinia carotovora*, causadores de doenças em cenoura, principalmente no armazenamento. Foi observado que *B. subtilis* (IMP 215) conseguiu controlar os três patógenos *in vitro*, já no controle *in vivo* em armazenamento, *B. subtilis* controlou apenas dois patógenos (*A. radicina* e *E. carotovora*).

Dentre os principais benefícios propostos pelo uso de *B. subtilis* em plantas estão o controle de fitopatógenos, e o efeito adicional de promover o crescimento, em razão do incremento de fixação de nitrogênio, solubilização de nutrientes, síntese de fitormônios. *B. subtilis* também dispõe da habilidade de ocupar diferentes nichos e apresentar uma maior versatilidade fisiológica (LANNA FILHO; FERRO; PINHO, 2010). Com o intuito de analisar o aumento da produção de soja com o uso de *B.*

subtilis, Santos Filho (2020) avaliou a eficiência de um produto comercial à base de *B. subtilis* no incremento de biomassa e acúmulo de nutrientes nos grãos de cultivares de soja na presença e ausência de molibidênio, e concluiu que o uso de *B. subtilis* em doses de 0; 0,25; 0,50; 0,75 e 1 litro de produto/50 kg de sementes, com ou sem molibidênio não afetaram significativamente a produtividade das plantas de soja e os teores nutricionais nos grãos estiveram dentro do nível adequado.

Outra espécie utilizada no controle de doenças de plantas é *Bacillus pumilus*. O modo de ação dessa espécie é baseado em competição por nutrientes e espaço, também podendo estimular o sistema de defesa da planta. *B. pumilus* age de forma preventiva e busca impedir o progresso da doença, principalmente contra o desenvolvimento de oídios, míldios, ferrugens e outros patógenos em cereais, frutíferas, hortaliças e uva (COPING, 2009, BARGABUS et al., 2004).

Luna, Mariano e Souto-Maior (2002) avaliaram o potencial da atividade antibiótica de nove isolados do gênero *Bacillus* testados *in vitro* contra *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em crucíferas. Dos nove isolados estudados, somente quatro mostraram atividade antibiótica, dentre os quais estão *B. pumilus* C116 e *B. subtilis* R14.

Santos et al. (2006) testaram líquidos produzidos pela fermentação de isolados de *Bacillus* com e sem células bacterianas no controle da mancha-aquosa do melão, causada por *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, através do tratamento de sementes infectadas. Foram realizados testes de atividade hemolítica e surfactante, que são indicadores de produção de lipopeptídeos, sendo observado que fermentados de *B. pumilus* C116 produziram maior halo de hemólise, inibindo o crescimento do patógeno, seguidos de *B. subtilis* R14 e *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7, sugerindo alta atividade antibiótica, indicando o controle da mancha-aquosa em plântulas de melão pelo tratamento de sementes com as espécies de *Bacillus* testadas.

Venturini, Brandi e Bettiol (2014) averiguaram os efeitos de *B. pumilus* (qst 2808) e *B. subtilis* (qst 713) sobre *Thielaviopsis paradoxa*, patógeno que causa a podridão abacaxi em colmos da cana-de-açúcar. Foi utilizado o método de antagonismo direto em placa de petri e crescimento micelial na presença dos metabólitos desenvolvidos pelos agentes biológicos. Os autores concluíram que dois agentes de biocontrole apresentaram efeitos antagônicos significativos contra o patógeno, destacando a espécie *B. subtilis* em todos os experimentos (teste de pareamento no tratamento de 48 h; e teste de crescimento micelial nas doses de 0,1%, 1% e 10%, com *B. pumilus*

tendo efeito semelhante apenas em concentração máxima, 10%).

Avaliando os efeitos de *B. subtilis* e *B. pumilus* combinados com fertilização mineral e subprodutos da indústria do álcool e açúcar no desenvolvimento inicial das mudas de cana-de-açúcar, Santos, Kandasamy e Rigobelo (2018) concluíram que a inoculação de *B. subtilis*, *B. pumilus* e uma mistura de ambos promoveram aumento de matéria seca das raízes, maiores número e diâmetro de perfilhos produzidos. E a fertilização mineral com *B. pumilus*, proporcionou aumento de fertilidade do solo, diminuição dos efeitos adversos da fertilização com vinhaça, além de promoção do crescimento da planta e alto rendimento e produtividade na produção de cana-de-açúcar.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Patologia de Sementes e em casa de vegetação do Departamento de Proteção Vegetal (DProt), da Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA), UNESP, Câmpus de Botucatu, SP. Os ensaios consistiram de duas etapas: a avaliação do efeito *in vitro* dos antagonistas *B. subtilis* e *B. pumilus* sobre o patógeno *A. dauci* e a avaliação do efeito do tratamento de sementes de cenoura cultivar Brasília com esses antagonistas no controle de *A. dauci* e na qualidade sanitária e fisiológica das sementes.

3.1 Efeito *in vitro* de *B. subtilis*, *B. pumilus* sobre *A. dauci*

3.1.1 Obtenção dos antagonistas *B. subtilis*, *B. pumilus* e do isolado de *A. dauci*

Os antagonistas (produtos comerciais) *B. subtilis*, linhagem QST 713 (Serenade®) e *B. pumilus*, linhagem QST 2808 (Sonata®) foram utilizados nos experimentos. Para a obtenção das colônias bacterianas dos antagonistas foi realizado o processo de purificação das bactérias por meio de diluição. Da solução estoque (produto comercial), foram transferidos 100 µL para *ependorf* com 900 µL de água destilada autoclavada, sendo, em seguida, riscada uma alçada da solução em forma de estrias em meio nutriente-sacarose-ágar (NSA: 23 g de meio nutriente-ágar + 5 g de sacarose por litro de meio NSA) e incubados em estufa bacteriológica a 25°C durante 48 horas. Após a incubação por 48 horas a 25°C, cada colônia bacteriana isolada foi repicada para uma nova placa com meio NSA e incubados nas mesmas condições anteriores.

Para a condução dos estudos, foi utilizado um isolado de *A. dauci* conservado em água esterilizada (CASTELLANI, 1939), pertencente à coleção fúngica do Laboratório de Patologia de Sementes, do DProt, da FCA/UNESP, Câmpus de Botucatu, SP. O isolado foi reativado em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA), e colocado em incubadoras do tipo BOD, a 25°C e fotoperíodo por 7 dias. Após o crescimento, o fungo foi repicado para novas placas de Petri contendo meio BDA e incubado nas mesmas condições, para obtenção de colônias puras. Sua patogenicidade foi comprovada com a inoculação em folha de cenoura e reprodução de sintoma.

3.1.2 Teste de antagonismo direto sobre *A. dauci*

O efeito dos antagonistas sobre o patógeno foi avaliado pelo método do pareamento, contrapondo o patógeno e antagonistas em placas de Petri. Os isolados de *Bacillus* foram reativados e cultivados em meio NSA, incubados em estufa bacteriológica a 25°C durante 48 horas. Para o teste de pareamento, discos de 0,5 cm de diâmetro contendo micélio de *A. dauci* foram depositados a 0,5 cm da borda de placas de Petri contendo meio de cultura BDA. Do lado oposto ao patógeno, a 0,5 cm da borda, foi depositado um disco de papel de filtro (0,5 cm de diâmetro), previamente autoclavado, embebido nas suspensões bacterianas de *B. subtilis* e *B. pumilus* calibradas para a concentração de 10^8 UFC/ mL. Foram adotados três períodos para a deposição dos antagonistas e do fitopatógeno: simultaneamente; antagonistas depositados 24 horas após *A. dauci*; e antagonistas depositados 24 horas antes *A. dauci*. A incubação foi realizada em câmara BOD, a 25°C com fotoperíodo de 12 horas. No tratamento testemunha, o disco de papel de filtro foi embebido em água destilada autoclavada.

A avaliação foi realizada através da medição, em centímetros, do halo de inibição formado pelos agentes antagonistas. As avaliações foram realizadas diariamente até o tratamento testemunha atingir as bordas da placa de Petri, representando o crescimento máximo, no sexto dia após a instalação de cada ensaio, sendo considerados, para a análise estatística, os resultados desta última avaliação.

O experimento foi executado em duplicata (Ensaio 1 e 2), sendo conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com sete tratamentos e quatro repetições, sendo cada placa de Petri considerada uma repetição.

Os resultados foram submetidos à análise não paramétrica pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade (ZAR, 1996).

3.2 Efeito de *B. subtilis* e *B. pumilus* sobre a qualidade sanitária e fisiológica de sementes de cenoura infectadas por *A. dauci*

3.2.1 Obtenção do lote de trabalho e tratamento de sementes com *B. subtilis* e *B. pumilus*

Para a obtenção de sementes infectadas por *A. dauci*, o fungo foi cultivado em placas de Petri contendo meio de cultura BDA. Após sete dias de incubação, a 25°C e fotoperíodo de 12 horas, discos de 0,5 cm de diâmetro foram retirados da periferia da colônia fúngica e transferidos para placas de Petri contendo BDA acrescido de manitol, no potencial hídrico de 1,0 Mpa (73,77g/L). A concentração do manitol foi determinada pela fórmula de Van't Hoff (SALISBURY; ROSS, 1991). Sementes de cenoura, previamente desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio a 2% por um minuto, foram depositadas em camada única, sobre a colônia fúngica, permanecendo em contato com o patógeno por 24 horas. Outra porção de sementes foi submetida às mesmas condições, porém sem a presença do inóculo no meio. Após a inoculação, as sementes passaram novamente pela desinfestação superficial e foram colocadas em cima de folhas de papel absorvente em câmara de fluxo laminar com portas fechadas, deixando-se secar naturalmente pelo período de 2 horas. As sementes (inoculadas e sadias) foram misturadas, de modo a se obter um lote de trabalho com 20% de infecção.

Para a realização do tratamento biológico das sementes, as suspensões bacterianas de *B. subtilis* e *B. pumilus* provenientes de colônias cultivadas em meio NSA, a 25°C por 48 horas, em estufa bacteriológica, foram calibradas para a concentração de 1×10^8 UFC/mL. As sementes de cenoura foram acondicionadas em frascos tipo duran de 250 mL (400 sementes por recipiente), aos quais foram adicionadas, individualmente, as suspensões dos antagonistas (5 mL de cada suspensão para 400 sementes). Os frascos foram agitados manualmente para a total cobertura das sementes. As sementes ficaram imersas em suspensão dos antagonistas pelo período de 12 horas. O tratamento químico foi realizado da mesma maneira que o biológico, sendo as sementes imersas por 12 horas em solução do fungicida Manzate® WG (ditiocarbamato) na concentração de 750 ppm. Foram incluídos dois tratamentos considerados controle, um composto por sementes inoculadas e outro, por sementes não inoculadas, ambos imersos apenas em água.

destilada. Os frascos tipo duran contendo as sementes dos cinco tratamentos (*B. subtilis*, *B. pumilus*, fungicida didiocarbamato, sementes inoculadas não tratadas, e sementes não inoculadas não tratadas) foram colocados em incubadora tipo B.O.D a temperatura de 25°C, sem fotoperíodo, por 12 horas, e posteriormente as sementes foram tiradas dos frascos, colocadas para secar dentro da câmara de fluxo sobre papel absorvente autoclavado em temperatura ambiente por 24 horas.

3.2.2 Qualidade sanitária das sementes de cenoura

A avaliação da incidência de *A. dauci* nas sementes foi realizada pelo método do papel de filtro (*blotter test*) (BRASIL, 2009). Em cada placa de Petri (9,0cm de diâmetro), foram depositadas três folhas de papel de filtro previamente umedecidas em água destilada, sobre as quais foram distribuídas 25 sementes equidistantes. As sementes foram incubadas à temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas sob luz branca fluorescente. Após sete dias de incubação, as sementes foram examinadas, individualmente, sob microscópio estereoscópico, para a detecção do fungo, sendo os resultados expressos em porcentagem de sementes com *A. dauci*.

O experimento foi realizado em duplicata (ensaios 1 e 2), no delineamento experimental inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e oito repetições, sendo a parcela experimental constituída por uma placa de Petri com 25 sementes de cenoura. Os dados, transformados em $\arcsin \sqrt{(x/100)}$, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK) a 5% de probabilidade.

3.2.3 Qualidade fisiológica das sementes de cenoura

O efeito do tratamento das sementes com os antagonistas sobre o potencial fisiológico destas foi avaliado em laboratório, por meio do teste de germinação em rolo de papel e vigor (primeira contagem de germinação), e em casa de vegetação, pelo índice de velocidade de emergência e pelo desenvolvimento das plântulas (comprimento e massa fresca e seca da parte aérea e radicular).

3.2.3.1 Germinação (G) e primeira contagem de germinação (PCG)

Os testes de germinação (G) e primeira contagem de germinação (PCG) foram realizados empregando-se a técnica do rolo de papel (RP), tendo-se o papel de germinação como substrato. Para cada tratamento, foram adotadas quatro repetições de 50 sementes, totalizando 200 sementes. O papel de germinação foi pré-umedecido com quantidade de água deionizada equivalente a 2,5 vezes o peso do substrato seco. As sementes foram distribuídas sobre duas folhas e sobrepostas com uma terceira folha, embrulhadas em forma de rolo. Os rolos foram mantidos no germinador, na posição vertical, a 25°C. As avaliações foram realizadas aos cinco dias (primeira contagem de germinação) (NAKAGAWA,1999) e aos nove dias após a semeadura (germinação), computando-se a porcentagem de plântulas normais para cada tratamento (BRASIL, 2009).

3.2.3.2 Índice de velocidade de emergência (IVE)

O teste de índice de velocidade de emergência (IVE) foi conduzido em casa de vegetação em copos descartáveis com capacidade volumétrica de 770 mL contendo substrato comercial esterilizado, com dez repetições de quatro sementes por tratamento. Foi computado o número de plântulas normais emergidas, diariamente, até a estabilização da emergência, aos 21 dias após a instalação do experimento, sendo esta a última leitura do teste. Com base no número de plântulas emergidas, foi calculado o IVE, empregando-se a seguinte fórmula:

$$IVE = \frac{E_1}{N_1} + \frac{E_2}{N_2} + \dots + \frac{E_n}{N_n} \quad (1)$$

Onde, $N_1, N_2, \dots, N_n$ é o número de dias decorridos da semeadura até a primeira, segunda, ..., última contagem; $E_1, E_2, \dots, E_n$ é o número de plântulas emergidas, computadas na primeira, segunda, ..., última contagem (BRASIL, 2009).

3.2.2.3 Comprimento e massa de plântulas

Ao final do teste de emergência, foram aferidos os comprimentos e as massas secas e frescas da parte aérea (CPA, MFA e MSA, respectivamente) e do sistema radicular (CPR, MFR e MSR, respectivamente) das quatro plântulas/parcela, sendo os valores expressos em centímetros e miligramas, respectivamente.

3.2.2.4 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental empregado nos ensaios de potencial fisiológico das sementes foi o inteiramente casualizado, com as repetições especificadas em cada teste, conforme descrição anteriormente. Resultados expressos em porcentagem foram transformados para $\arcsin \sqrt{(x/100)}$.

Inicialmente, em cada ensaio, os dados foram submetidos à avaliação de normalidade e homogeneidade de variâncias. Dessa forma, para as variáveis cujos dados não violaram a normalidade e homogeneidade, realizou-se análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK). Os dados das variáveis que violaram normalidade e homogeneidade passaram pela transformação de box cox. Em seguida, realizou-se a ANOVA dos dados transformados que não violaram a normalidade e homogeneidade e médias comparadas pelo teste SNK. Por outro lado, para os dados que violaram, realizou-se a análise não paramétrica pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade (ZAR, 1996).

4 RESULTADOS

4.1 Efeito *in vitro* de *B. subtilis*, *B. pumilus* sobre *A. dauci*

Não houve diferença entre os tratamentos para a formação do halo de inibição, mostrando que os isolados de *B. subtilis* e *B. pumilus* testados não apresentaram efeito antagonista significativo contra o fungo *A. dauci* (Tabela 1).

Tabela 1 – Halo de inibição em centímetros dos antagonistas *Bacillus subtilis* e *B. pumilus* sobre *Alternaria dauci* com diferentes períodos de deposição dos microrganismos no meio de cultura

Tratamentos	Ensaio 1	Ensaio 2
	Mediana	Mediana
<i>B. subtilis</i> deposição simultânea	1,5 a	1,0 a
<i>B. subtilis</i> 24 horas após <i>A. dauci</i>	1,2 a	1,8 a
<i>B. subtilis</i> 24 horas antes de <i>A. dauci</i>	1,2 a	1,0 a
<i>B. pumilus</i> deposição simultânea	1,0 a	1,0 a
<i>B. pumilus</i> 24 horas após <i>A. dauci</i>	3,9 a	4,0 a
<i>B. pumilus</i> 24 horas antes de <i>A. dauci</i>	1,5 a	1,5 a
Testemunha	0,0 a	0,0 a
P-valor	0,17	0,071
C.V. (%)	18,51	23,27

Em cada ensaio:

a – as medianas não diferiram pelo teste Kruskal-Wallis ao nível de 5% de probabilidade.

4.2 Efeito do tratamento com *B. subtilis* e *B. pumilus* sobre a qualidade sanitária das sementes

No ensaio 1, o tratamento com o fungicida ditiocarbamato resultou em menor incidência de *A. dauci*, sem diferir das sementes não inoculadas não tratadas. Os tratamentos com os antagonistas *B. subtilis* e *B. pumilus* reduziram a incidência do patógeno, sem diferirem entre si. No ensaio 2, os tratamentos das sementes infectadas com os dois antagonistas testados também resultaram em redução na incidência do patógeno, apresentando o mesmo desempenho do tratamento com o fungicida (Tabela 2).

Tabela 2 – Incidência de *Alternaria dauci* em sementes de cenoura tratadas com *Bacillus subtilis*, *B. pumilus* e fungicida ditiocarbamato

Tratamentos	Ensaio 1		Ensaio 2	
	arc sen ($\sqrt{x/100}$)	% ¹	arc sen ($\sqrt{x/100}$)	% ¹
<i>Bacillus subtilis</i>	0,539 b	26,5	0,490 b	22,5
<i>Bacillus pumilus</i>	0,516 b	24,5	0,479 b	21,5
Fungicida ditiocarbamato	0,384 a	14,5	0,428 b	17,5
Sementes inoculadas não tratadas	0,770 c	48,5	0,745 c	46,0
Sementes não inoculadas não tratadas	0,359 a	12,5	0,288 a	9,5
P-valor	0,235		0,276	
C.V. (%)	15,13		19,16	

Em cada ensaio (coluna):

¹ Dados originais de porcentagem de incidência de *Alternaria dauci* em sementes de cenoura.

a, b, c – médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste de SNK ao nível de 5% de probabilidade.

4.3 Efeito do tratamento com *B. subtilis* e *B. pumilus* sobre a qualidade fisiológica das sementes

4.3.1 Germinação (G) e primeira contagem de germinação (PCG)

A presença de *A. dauci* em sementes não interferiu no vigor e germinação desta, uma vez que não houve diferença significativa entre as sementes inoculadas e não inoculadas. O tratamento com *B. subtilis* proporcionou resultados de germinação e PCG semelhantes ao da testemunha não inoculada, nos dois ensaios, enquanto a microbiolização com *B. pumilus* reduziu a germinação e o vigor no primeiro ensaio, tendo sido semelhante à *B. subtilis* no segundo. O tratamento químico proporcionou baixos valores de germinação e vigor (Tabela 3).

Tabela 3 – Porcentagem de primeira contagem de germinação (PCG) e porcentagem de germinação (G) de sementes de cenoura submetidas ao tratamento com *Bacillus subtilis*, *B. pumilus* e fungicida ditiocarbamato

Tratamentos	Ensaio 1		Ensaio 2	
	PCG	G	PCG	G
	Mediana ¹	Mediana ¹	Mediana ¹	Mediana ¹
<i>Bacillus subtilis</i>	58,0 ab	86,0 a	52,0 ab	79,0 ab
<i>Bacillus pumilus</i>	29,0 c	51,0 b	25,0 b	37,0 b
Fungicida ditiocarbamato	40,0 bc	56,0 ab	30,0 b	43,0 b
Sementes inoculadas não tratadas	47,0 abc	64,0 ab	55,0 a	84,0 a
Sementes não inoculadas não tratadas	67,0 a	91,0 a	52,0 ab	77,0 ab
P-valor	0,015	0,022	0,021	0,042
C.V. (%)	18,71	17,26	17,98	15,62

Em cada ensaio (coluna):

¹- Medianas dos dados originais de porcentagem de primeira contagem de germinação (PCG) e porcentagem de germinação (G);

a, b – medianas seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ao nível de 5% de probabilidade.

4.3.2 Índice de velocidade de emergência (IVE)

Os resultados de IVE (Tabela 4) indicaram que os tratamentos com *B. subtilis*, *B. pumilus* e do fungicida não interferiram na velocidade de emergência das sementes, visto que, embora tenha sido observada uma ligeira redução no IVE com as sementes tratadas, não houve diferença significativa para esta variável.

Tabela 4 – Índice de velocidade de emergência de plântulas de cenoura provenientes de sementes submetidas ao tratamento com *Bacillus subtilis*, *B. pumilus* e fungicida ditiocarbamato

Tratamentos	Ensaio 1 IVE	Ensaio 2 IVE
<i>Bacillus subtilis</i>	0,4533 a	0,5294 a
<i>Bacillus pumilus</i>	0,4549 a	0,5281 a
Fungicida ditiocarbamato	0,4808 a	0,5274 a
Sementes inoculadas não tratadas	0,4002 a	0,5338 a
Sementes não inoculadas não tratadas	0,4850 a	0,6140 a
P-valor	0,636	0,585
C.V. (%)	29,35	25,84

Em cada ensaio (coluna):

a – as médias não diferiram pelo teste de SNK ao nível de 5% de probabilidade.

4.3.3 Comprimento e massa de plântulas

Não houve diferença significativa entre os tratamentos para o comprimento radicular e da parte aérea (Tabela 5). De maneira geral, este comportamento também foi observado para a massa fresca e seca das plântulas (Tabela 6).

Tabela 5 – Comprimento da parte aérea (CPA) e radicular (CPR) de plântulas de cenoura provenientes de sementes submetidas ao tratamento com *Bacillus subtilis*, *B. pumilus* e ditiocarbamato

Tratamentos	Ensaio 1		Ensaio 2	
	CPA (cm)	CPR (cm)	CPA (cm)	CPR (cm)
<i>Bacillus subtilis</i>	3,6 a	18,1 a	3,5 a	15,5 a
<i>Bacillus pumilus</i>	4,3 a	21,3 a	3,3 a	15,6 a
Fungicida ditiocarbamato	4,1 a	19,3 a	3,6 a	14,6 a
Sementes inoculadas não tratadas	4,0 a	20,0 a	3,5 a	15,9 a
Sementes não inoculadas não tratadas	3,9 a	18,8 a	4,2 a	18,1 a
P- valor	0,142	0,340	0,356	0,521
C.V. (%)	16,13	18,79	29,24	28,95

Em cada ensaio (coluna):

a – as médias não diferiram pelo teste de SNK ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 6 – Massa fresca aérea (MFA), massa seca aérea (MSA), massa fresca radicular (MFR), e massa seca radicular (MSR) de plântulas de cenoura provenientes de sementes submetidas ao tratamento com *Bacillus subtilis*, *B. pumilus* e ditiocarbamato

Tratamentos	Ensaio 1				Ensaio 2			
	MFA (mg) ¹	MSA (mg) ¹	MFR (mg) ¹	MSR (mg) ¹	MFA (mg) ¹	MSA (mg) ¹	MFR (mg) ¹	MSR (mg) ¹
<i>Bacillus Subtilis</i>	16,0 a	5,0 a	28,0 a	5,0 a	16,0 a	6,0 ab	24,0 a	4,0 a
<i>Bacillus Pumilus</i>	17,0 a	4,0 a	36,0 a	5,0 a	12,0 a	5,0 ab	22,0 a	5,0 a
Fungicida Ditiocarbamato	18,0 a	6,0 a	34,0 a	5,0 a	16,0 a	7,0 ab	26,0 a	5,0 a
S. inoculadas não tratadas	17,0 a	5,0 a	39,0 a	5,0 a	14,0 a	4,0 b	26,0 a	5,0 a
Sementes não Inoculadas	16,0 a	6,0 a	28,0 a	7,0 a	17,0 a	8,0 a	34,0 a	7,0 a
P-valor	0,908	0,179	0,682	0,211	0,577	0,035	0,191	0,427
C.V. (%)	38,04	44,68	48,15	53,85	44,62	64,19	43,96	50,90

Em cada ensaio (coluna):

a – as medianas não diferiram pelo teste de Kruskal-Wallis ao nível de 5% de probabilidade.

5 DISCUSSÃO

O uso indiscriminado e difundido de fungicidas químicos sintéticos é apontado como a causa do desenvolvimento de resistência em populações de fitopatógenos, acarretando no desenvolvimento de doenças graves nas culturas. Na tentativa de contornar esse problema, há um crescente interesse na utilização de agentes de biocontrole com atividade antagonista sobre fitopatógenos (ALDIBA; ESCOV, 2019).

Espécies de *Bacillus* têm sido utilizadas na agricultura, atuando como promotores de crescimento e como agentes de biocontrole contra doenças e pragas (CLEMENTE et al., 2016). Segundo Kupper; Gimenes-Fernandes e Goes (2003), o gênero *Bacillus*, e particularmente a espécie *B. subtilis*, representa um excelente agente de controle biológico em função de sua capacidade de produzir metabólitos que suportam temperaturas altas, possibilitando a formulação de bioprodutos. Para Aldiba e Escov (2019), o screening *in vitro* de microrganismos candidatos ao controle biológico de fitopatógenos deve ser realizado, uma vez que há diferenças nas características de promoção de crescimento e ação antimicrobiana entre os isolados.

Pesquisas *in vitro* relatam a ação inibitória do desenvolvimento de espécies de *Alternaria* por espécies de *Bacillus* e outros antagonistas. Porto (2016) observou a formação de halo de inibição de crescimento de *A. alternata* por *B. subtilis*, atribuindo essa ação antagonista ao mecanismo de antibiose. Da mesma forma, Souza (2018) relatou que isolados de *Bacillus* sp afetaram o desenvolvimento de *A. alternata* pela produção de metabólitos tóxicos ao fungo, também atuando por antibiose. Tozlu et al. (2018) verificaram que, além de *B. subtilis*, *B. pumilus* e *B. megaterium* também apresentaram ação antagônica *in vitro* contra *A. alternata*. Aldiba; Escov (2019) testaram a ação antagônica de duas espécies de *Bacillus* (*B. mycoides* e *B. thuringiensis*), além de *Pseudomonas brassicacearum* e *Trichoderma* sp., verificando que *B. thuringiensis*, *P. brassicacearum* e *B. thuringiensis* apresentaram forte redução de crescimento de *A. solani*, com efeito protetivo mais pronunciado (aplicação do antagonista antes do patógeno).

Os resultados do presente trabalho não detectaram esse efeito inibitório *in vitro* pelas espécies *B. subtilis* e *B. pumilus* sobre *A. dauci*. Apesar da formação de halo de inibição das espécies antagonistas sobre o patógeno, não houve diferença significativa para o tratamento testemunha. Resultados semelhantes foram obtidos por Lazzaretti; Menten; Bettiol (1994), que avaliaram a ação *in vitro* de isolados de *B.*

subtilis contra patógenos associados a sementes de feijão e trigo, e verificaram que alguns fungos apresentaram menor sensibilidade aos metabólitos dos antagonistas. Segundo esses autores, diversos fatores podem ter contribuído para o crescimento micelial dos fungos na presença de metabólitos de *B. subtilis*, incluindo: quantidade de metabólitos produzidos insuficiente para inibir o crescimento micelial; menor sensibilidade dos patógenos que apresentaram crescimento aos metabólitos produzidos; adaptação ou resistência dos fungos aos metabólitos; degradação dos metabólitos por enzimas fúngicas; degradação e/ou volatilização dos metabólitos, com perda das características antagônicas destes; e constituição química dos metabólitos produzidos, com variações quanto à termoestabilidade, degradação, volatilização entre outras, reforçando que cada fungo pode apresentar sensibilidade variada a diferentes compostos químicos produzidos pelas bactérias.

O emprego de antagonistas no tratamento de sementes também tem sido investigado. Para ser considerado eficiente e aplicável, o tratamento de sementes deve controlar fitopatógenos associados a elas, sem prejudicar a qualidade fisiológica das sementes tratadas.

No tocante ao aspecto fitossanitário, no presente estudo, as espécies de *Bacillus* proporcionaram redução da incidência de *A. dauci*, apesar dos resultados *in vitro* com estes antagonistas não terem sido satisfatórios. O teste de sanidade revelou potencial de emprego dessas bactérias no tratamento das sementes de cenoura para o controle deste fungo. Convém ressaltar, no entanto, que embora tenha sido reduzida com a microbiolização, a incidência do patógeno permaneceu alta. A ação patogênica de *A. dauci* é relatada em culturas como cenoura (KIM, MATHUR, 2006), salsa (PEDROSO et al, 2010) e coentro (REIS et al, 2006), sendo o fungo transmitido por sementes, o que reforça a necessidade da obtenção de sementes sem a sua presença. Contrariamente ao obtido neste trabalho, Koch et al (2010), testando métodos alternativos para controlar *A. dauci* e *A. radicina* em sementes de cenoura, os quais incluíam isolados e formulações comerciais de *B. subtilis*, verificaram que os produtos comerciais não proporcionaram resultados satisfatórios no controle destes fungos. Segundo os autores, uma hipótese para essa falha dos indutores em proteger as sementes de patógenos pode estar associada à absorção em quantidade insuficiente do antagonista, o qual poderiam não atingir os tecidos fisiologicamente ativos das plântulas em desenvolvimento. Convém ressaltar que os autores trabalharam com lote de sementes altamente infectado com as espécies de *Alternaria*. Esses aspectos

evidenciam a necessidade de otimização da microbiolização das sementes de cenoura a fim de se obter um controle mais eficiente do patógeno.

Embora a incidência de *A. dauci* tenha significativamente mais alta nas sementes inoculadas em relação às não inoculadas, a presença do fungo parece não ter interferido no vigor (PCG) e germinação, nos testes de laboratório. Resultados semelhantes haviam sido relatados por Reis et al (2006), que verificaram que a presença de *A. dauci* e *A. alternata* não interferiu na germinação e vigor em sementes de coentro, e por Lima et al (2016), que observaram que essas espécies não afetaram a qualidade fisiológica das sementes de cenoura, destacando que, mesmo o lote com incidência mais alta dos fungos apresentou boa germinação e vigor. Resultados contrários a esses relatados também já foram observados. Segundo Kim e Mathur (2006), a incidência de *A. radicina* e *A. dauci* afetou a germinação das sementes em teste em papel; esses autores relataram que a alta incidência de *A. alternata* nas sementes não interferiu na germinação. Pedroso et al. (2010) utilizaram dois métodos para inocular *A. dauci* e *A. alternata* em sementes de cenoura (imersão em suspensão de conídios e restrição hídrica) e avaliar a interferência destes fungos na qualidade fisiológica e desenvolvimento de plântulas em condições de laboratório e casa-de-vegetação. Nos testes de laboratório, *A. dauci* promoveu redução na germinação e PCG e aumento na porcentagem de sementes mortas. Tanto Kim e Mathur (2006) quanto Pedroso et al (2010) ressaltaram que a interferência em testes de casa de vegetação divergiu daquela observada em condições de laboratório, destacando a influência do ambiente na ação do patógeno.

O tratamento das sementes com as espécies de *Bacillus* não resultou em incremento da germinação e vigor neste trabalho. Não há relatos da ação destas bactérias sobre a germinação e vigor de sementes microbiolizadas em patossistemas semelhantes ao deste estudo. No entanto, resultados semelhantes foram relatados por Junges et al. (2013) e Buchelt et al. (2019), que constataram que o tratamento de sementes de milho com *B. subtilis* não interferiu na germinação.

Por outro lado, Junges et al. (2013) relataram redução na PCG das sementes tratadas. Junges et al (2013) e Bulchelt et al. (2019) atentam para o fato de que o período de contato do antagonista no tratamento pode ser responsável pela ausência de efeito promotor do antagonista.

No presente estudo, a presença de *A. dauci* nas sementes não interferiu no desenvolvimento das plântulas, não tendo sido detectadas diferenças entre as

testemunhas inoculada e não inoculada para as variáveis IVE, comprimento da parte aérea (CPA) e radicular (CPR) das plântulas, e massa fresca e seca da parte aérea (MFA e MSA) e radicular (MFR e MSR). Kim e Mathur (2006) verificaram que a incidência de *A. radicina* e *A. dauci* em sementes de cenoura afetou o crescimento das plântulas normais em teste em papel, mas essa interferência não foi observada em solo. Segundo Pedroso et al. (2010), em casa de vegetação, *A. dauci* e *A. alternata* não interferiram na emergência e IVE quando as sementes foram inoculadas por imersão, mas houve redução nestas variáveis quando foi feita a inoculação por restrição hídrica. Quanto ao comprimento e peso das plântulas, esses autores não observaram interferência dos patógenos em casa de vegetação.

Neste trabalho, a microbiolização das sementes não resultou em incremento no desenvolvimento das plântulas em casa de vegetação, também não havendo diferenças entre os tratamentos para variáveis testadas. Dognini (2017) não constatou interferência no IVE de cenoura tratadas com produtos biológicos à base de *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp. Buchelt et al (2019) observaram que *Bacillus* sp. não interferiu no comprimento e na massa fresca e seca das partes aéreas e radiculares. Em alguns estudos com tratamento de sementes com espécies de *Bacillus*, foi observada que a ação destas sobre características fisiológicas é genótipo dependente. Silva et al. (2019) aplicaram bactérias promotoras de crescimento em sementes de diferentes genótipos e verificaram dependência entre esse fator e isolados da bactéria, de modo que a interferência em germinação, PCG e IVE varia com o genótipo e a bactéria. Da maneira semelhante, Oliveira Júnior (2020) constatou que aplicação de produtos à base de *Bacillus* em sementes de alface proporcionou efeitos benéficos na massa fresca e seca, mas esse efeito depende do genótipo e da dose do produto.

Diante do exposto, percebe-se que a microbiolização de sementes é um processo complexo, por envolver agentes biológicos, que podem ser influenciados em maior ou menor grau. Outros fatores como a localização dos patógenos nas sementes, o alcance dos produtos aplicados nas sementes, o momento, a dose e a técnica de aplicação, além do genótipo da espécie vegetal devem ser considerados. Os resultados obtidos revelam que *B. subtilis* e *B. pumilus* apresentam potencial de controle de *A. dauci* em sementes de cenoura, apesar de não terem apresentado efeito inibitório satisfatório nos testes *in vitro*, porém, novos estudos se fazem necessários para reduzir ainda mais a incidência do patógeno nas sementes. Apesar

de, em geral, não ter ocorrido interferência na qualidade fisiológica, novas pesquisas podem auxiliar a otimizar os efeitos do tratamento.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho, nas condições em que os experimentos foram conduzidos, permitem concluir que:

- a) as espécies de *Bacillus* testadas não inibem o desenvolvimento *in vitro* de *A. dauci*.
- b) o tratamento biológico com *B. subtilis* e *B. pumilus* reduz a incidência de *A. dauci* nas sementes de cenoura.
- c) *B. subtilis* não interfere na germinação e vigor das sementes de cenoura. *B. pumilus*, tendo apresentado efeitos distintos na primeira contagem de germinação e germinação das sementes nos dois ensaios, precisa ser melhor investigado quanto à viabilidade de seu emprego.
- d) tratadas com esse antagonista sugere a necessidade de mais investigações para a sua recomendação na microbiolização de sementes de cenoura.

REFERÊNCIAS

- ALDIBA, A.; ESCOV, I. Biological control of early blight on potato caused by *Alternaria solani* by some bioagents. Advances in Biological Sciences Research. In: 1st International Symposium Innovations in Life Sciences (ISILS 2019). **Anais**, Belgorod, Russia, 2019.
- ALMEIDA, K. **Adubos verdes na produção de alface e cenoura, sob sistema orgânico**. 2009. 114p. Tese (Doutorado em Agronomia / Horticultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2009.
- ANUÁRIO BRASILEIRO DE HORT&FRUTI 2021. **Brazilian Vegetable Yearbook**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2018. 92p. Disponível em: < <https://www.editoragazeta.com.br/produto/anuario-brasileiro-de-horti-fruti-2021/> >. Acesso em: jul 2021
- BARGABUS, R. L.; ZIDACK, N.K.; SHERWOOD, J. E. e JACOBSEN, B. J. Screening for the identification of potential biological control agents that induce systemic acquired resistance in sugar beet. **Biological Control**, p. 342-350, 2004.
- BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa/CNPDA, p. 388, 1991.
- BRAGA JÚNIOR, G. M.; CHAGAS JUNIOR, A. F.; CHAGAS, L. F. B.; CARVALHO FILHO, M. R.; MILLER, L. O.; SANTOS, G. R. Controle biológico de fitopatógenos por *Bacillus subtilis* in vitro. **Biota Amazônia**, v. 7, n. 3, p. 45-51, 2017.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento. **Regras para análise de sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária: Brasília, 2009. 395p.
- BUCHELT, A. C.; METZLER, C. R.; CASTIGLIONI, J. L.; DASSOLLER, T. F.; LUBIAN, M. S. Aplicação de bioestimulantes e *Bacillus subtilis* na germinação e desenvolvimento inicial da cultura do milho. **Agricultura Neotropical**, v. 6, n. 4, p. 69-74, 2019.
- CARVALHO, M. L. M.; FRANÇA NETO, J. B., F.; KRZYZANOWSKI, F. C. Controle de qualidade na produção de sementes. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 27, n. 232, p. 52 – 58, 2006.
- CASTELLANI, A. The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 42, n. 3, p. 225-226, 1939.
- CAWOY, H., BETTIOL, W., FICKERS, P., ONGENA, M. 2011. *Bacillus*-Based biological control of plant diseases. In: ONGENA, M., CAWOY, H., STOYTICHEVA M. (Ed.). **Pesticides in the Modern World Pesticides Use and Management**. InTech, 2011. cap. 13, p.273-302.

CLEMENTE, J. M.; CARDOSO, C. R.; VIEIRA, B. S. E.; DA MATA FLOR, I. COSTA, R. L. Use of *Bacillus* spp. as growth promoter in carrot crop. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 35, p. 3355-335, 2016.

COPING, L.G. **The Manual of Biocontrol Agents**. 4 Ed. Croydon. British Crop Protection Council, 2009.

COOK, R.J; BAKER, K. F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. Minnesota, EUA. p. 60 – 62, 1983.

DOGNINI, A. C. **Interferências das aplicações de *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp. na qualidade das sementes de cenoura**. 2017. 93p. Dissertação (Mestrado em Agronomia / Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – USP, Piracicaba, 2017.

FAO (Food and Agriculture Organization of The United Nations) 2019. Production Statistics. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL/visualize>>. Acesso em: 17 Jul. 2021.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agroecologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa: UFV, 2000. 402p.

GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; SANTOS, A. F.; AUER, C. G. Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. **Floresta**, Curitiba, v. 30, n. 1/2, p. 155-165, 2000.

HENRY, G., THONART, P., ONGENA, M. PAMPs, MAMPs, DAMPs and others: An update on the diversity of plant immunity elicitors. **Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement**. v.16, p. 257-268, 2012.

INDEX FUNGORUM. Disponível em: <<http://www.indexfungorum.org/Names/NamesRecord.asp?RecordID=284025>>. Acesso em: jun. 2021.

JUNGES, E., TOEBE, M., SANTOS, R.F.D., FINGER, G., MUNIZ, M.F.B. Effect of priming and seed-coating when associated with *Bacillus subtilis* in maize seeds. **Ciência Agronômica**, v. 44(3), p. 520-526, 2013.

KIM, W. G.; MATHUR, S. B. Detection of *Alternaria* spp. in carrot seeds and effect of the fungi on seed germination and seedling growth of carrot. **The Plant Pathology Journal**, v. 22, n.1, p. 11-15, 2006.

KOCH, E.; SCHMITT, A.; STEPAHAN, D.; KROMPHARDT, C.; JAHN, M.; KRAUTHAUSEN, H. J.; FORSBERG, G.; WERNER, S.; AMEIN, T.; WRIGHT, S. A. I.; TINIVELLA, F.; GULLINO, M. L.; ROBERTS, S. J.; WOLF, J. V.D.; GROOT, S. P. C. Evaluation of non-chemical seed treatment methods for the control of *Alternaria dauci* and *A. radicina* on carrot seeds. **European Journal of Plant Pathology**, v.124, p.99-112, 2010.

KUPPER, K. C.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOES, A. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 251-257, 2003.

LANNA FILHO, R.; FERRO, H. M.; PINHO, R. S. C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas** v.4, n.2, p.12, 2010.

LAZZARETTI, E.; MENTEN, J. O. M.; BETTIOL, W. *Bacillus subtilis* antagonistas aos principais patógenos associados a sementes de feijão e trigo. **Fitopatologia Venezolana**, v.7 n.2, p. 42-46, 1994.

LEELASUPHAKUL, W. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. Postharvest. **Biology and Technology**, v.48, p.113-121, 2008.

LIMA, C. B.; RENTSCHLER, L. L. A.; BUENO, J. T.; BOAVENTURA, A. C. Plant extracts and essential oils on the control of *Alternaria alternata*, *Alternaria dauci* and on the germination and emergence of carrot seeds (*Daucus carota* L.). **Ciência Rural**, v.46, n.5, p.764-770, 2016.

LUNA, C.L.; MARIANO, R.L.R.; SOUTO-MAIOR, A.M. Production of a biocontrol agent for crucifers black rot disease. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v. 19, p. 133-140, 2002.

LOPES, C. A; REIFSCHNEIDER, F. J. B.; CHARCHAR, J. M. Cenoura (*Daucus carota*). Embrapa Hortaliças. **Sistemas de Produção**, v.5, 2008.

MADIGAN, M.; JOHN, M.; KELLY B.; DANIEL, B.; David, S. **Microbiologia de Brock**, 14ª ed. Porto Alegre, p. 960, 2016.

MARCUZZO, L. L.; SANTOS, J. C. Efeito da temperatura e do fotoperíodo na germinação *in vitro* de conídios de *Alternaria dauci*, agente etiológico da queima das folhas da cenoura. **Summa Phytopathol.**, Botucatu, v. 45, n. 2, p. 225-226, 2019.

MATOS, F. A. C.; LOPES, H. R. D.; DIAS, R. L.; ALVES, R. T. **Cenoura: Saiba como cultivar hortaliças para semear bons negócios**. Série: Agricultura familiar. SEBRAE, 2011. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/documents/1355126/9124396/cenoura.pdf/19c5dcd7-a384-4ada-9356-6f59f38f7883>>. Acesso em: 10 out 2021.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: KRZYŻANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: Abrates. cap. 2, p.1-24, 1999.

OLIVEIRA, A. P. **Controle de alternaria em sementes de cenoura: tratamentos alternativos**. 33p. 2015. Dissertação (Mestrado em Patologia de sementes) Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

OLIVEIRA JÚNIOR, P. P. **Bacillus subtilis na produção de alface**. 2020. 54p. Tese (Doutorado em Agronomia / Sistemas de Produção) – Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista “Julio Mesquita Filho”, Ilha Solteira, 2020.

PEDROSO, D. C.; MENEZES, V. O.; MUNIZ, M. F. B.; PIVETA, G.; TUNES, L. M.; MULLER, J.; MENEZES, N. L. Métodos de inoculação de *Alternaria alternata* e *A. dauci* em sementes de salsa e sua influência na qualidade fisiológica. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n.3, p. 79-85, 2010.

PEREIRA, B. R.; CARVALHO, A. D. F.; PINHEIRO, J. B.; PEREIRA, G. C. L. **Queima-das-folhas da cenoura**, 2019. Disponível em: <http://anapa.com.br/wp-content/uploads/2016/12/Queima_das_folhas_cenoura.pdf>. Acesso em: Jun. 2021.

PEREIRA, G. A. M. **Avaliação de produção e florescimento de cultivares de cenoura em duas regiões distintas do Alto Vale do Jequitinhonha, MG**. 37p. 2013. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2013.

PERSHAKOVA, T. V.; KUPIN, G. A.; MIHAYLYUTA, L. V.; BABAKINA, M. V.; PANASENKO, E. Y.; VIKTOROVA E. P. Investigation of antagonistic properties of bacteria *Bacillus subtilis* against carrot phytopathogenes *in vitro* and *in vivo* experiments. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v.10(6), p.1619-1622, 2018.

PORTO, B. L. **Avaliação do potencial de controle biológico da mancha marrom de Alternaria com Trichoderma spp., Bacillus subtilis e fertilizante organomineral**. 62 p. 2016. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2016.

RAMOS, N. P.; FLOR, E. P. O.; MENDONÇA, E. A. F.de; MINAMI, K. Envelhecimento acelerado em sementes de rúcula (*Eruca sativa* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 26, n. 1, p. 98-103, 2004.

REIS, A.; SATELIS, J. F.; PEREIRA, R. S.; NASCIMENTO, W. M. Associação de *Alternaria dauci* e *A. alternata* com sementes de coentro e eficiência do tratamento químico. **Horticultura Brasileira**, v.24, n.1, p.107-111, 2006.

RODRIGUES, C. S. **Nematoides das galhas associados à cultura da cenoura na região do Distrito Federal e reação de cultivares**. 2017. 131p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília-DF, 2017.

SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. **Plant physiology**. 4 ed. Belmont: Wadsworth, 1991. 682p.

SANTOS, E.R.; GOUVEIA, E.R.; MARIANO, R.L.R., SOUTO-MAIOR, A.M. Biocontrol of bacterial fruit blotch of melon by bioactive compounds produced by *Bacillus* spp. **Summa Phytopathologica**. v.32: 376-378. 2006.

SANTOS FILHO, A. L. **Doses de *Bacillus subtilis* na presença e ausência de molibdênio em dois cultivares de soja**. 2020. 35p. Tese (Doutorado em Agronomia / Sistemas de Produção) – Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista “Julio Mesquita Filho”, Ilha Solteira, 2020.

SANTOS, R. M.; KANDASAMY. S.; RIGOBELLO. E. C. Sugarcane growth and nutrition levels are differentially affected by the application of PGPR and cane waste. **Microbiology Open**. 2018. Disponível em: < <https://doi.org/10.1002/ mbo3.617>>. Acesso em: ago. 2021.

SILVA, M. E. C.; MELO, I. S.; NASCIMENTO, R. S.; ROSSI, P.; RAMOS, N. P. Germinação e vigor de girassol com uso de bactérias promotoras de crescimento. In: 13º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2019, **Anais**, 2019.

SILVA JÚNIOR, T. A. F.; SILVA, J. C.; SOMAN, J. M.; MARINGONI, A. C. Qual a principal doença da cenoura? **Campo e Negócios**. 2020. Disponível em: <https://revistacampoenegocios.com.br/qual-a-principal-doenca-da-cenoura/>. Acesso em: ago. 2021.

SOUZA, A. C. **Controle Biológico de *Alternaria alternata*, agente causal da mancha marrom de alternaria, por *Bacillus* spp.** 79 p. 2018. Dissertação (Mestrado em Agroecologia e Desenvolvimento Rural) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2018.

STOLARCZYK, J.; JANICK, J. Carrot: history and Iconography. **Chronica Horticulturae**, v.51, 2011.

TOZLU, E.; TEKINER, N., KOTAN, R.; ÖRTÜCÜ, S. Investigation on the biological control of *Alternaria alternata*. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, v.88, n.8, p.93-99, 2018.

VENTURINI, G. BRANDI, F. BETTIOL, W. Efeitos da antibiose e inibição de germinação por *Bacillus pumilus* e *Bacillus subtilis* em *Thielaviopsis paradoxa*. **Anais**, 22º Congresso Latinoamericano de Microbiologia e 4º Congresso Colombiano de Microbiologia, Cartagena, 2014. (Resumo).

VIEIRA, J. V.; PESSOA, H. B. S. V.; MAKISHIMA, N. **A cultura da cenoura (Coleção Plantar, 43)**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 1999. 77p. ISBN: 85-7383-068-9. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/162021/1/A-cultura-da-cenoura.pdf>>. Acesso em: Jun 2021.

ZAR, J. H. **Bioestatistical analysis**. 3º Ed. Prentice-Hall do Brasil Ltda., Rio de Janeiro, 1996.

ZHANG, J. X.; XUE, A. G. Biocontrol of sclerotinia stem rot (*Sclerotinia sclerotiorum*) of soybean using novel *Bacillus subtilis* strain SB24 under control conditions. **Plant pathology**, New York, v. 59, n. 2, p. 382-391, 2010.

ZHAO, Q., RAN, W., WANG, H. et al. Biocontrole da doença da murcha de *Fusarium* em melão com *Bacillus subtilis* Y-IV1. **BioControl**. v. 58, p.283–292, 2013.