

RAFAELA CARVALHO VARGAS

**POTENCIAL DE PROBIÓTICOS NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E NO
CONTROLE DA QUEIMA-DA-SAIA E DO MOFO-BRANCO DA ALFACE**

Botucatu

2024

RAFAELA CARVALHO VARGAS

**POTENCIAL DE PROBIÓTICOS NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E NO
CONTROLE DA QUEIMA-DA-SAIA E DO MOFO-BRANCO DA ALFACE**

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

Orientador(a): Wagner Bettiol

Coorientador(a): Flávia Rodrigues Alves
Patrício

Botucatu

2024

V297p

Vargas, Rafaela Carvalho

Potencial de probiótico na promoção de crescimento e no controle de queima-da-saia e do mofo-branco da alface / Rafaela Carvalho Vargas. -- Botucatu, 2024

82 p. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu

Orientadora: Wagner Bettiol

Coorientadora: Flávia Rodrigues Alves Patrício

1. Probióticos. 2. Controle Biológico. 3. Rhizoctonia solani. 4. Sclerotinia sclerotiorum. 5. Promoção de crescimento. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título:

POTENCIAL DE PROBIÓTICOS NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E NO CONTROLE DA QUEIMA-DA-SAIA E DO MOFO-BRANCO DA ALFACE

AUTORA: RAFAELA CARVALHO VARGAS

ORIENTADOR: WAGNER BETTIOL

COORIENTADORA: FLAVIA RODRIGUES ALVES PATRÍCIO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Agronomia (Proteção de Plantas), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. WAGNER BETTIOL (Participação Presencial)
Microbiologia Ambiental / Embrapa Meio Ambiente

Pesquisador Dr. MATHEUS APARECIDO PEREIRA CIPRIANO (Participação Presencial)
Centro de Solos e Recursos Ambientais / Instituto Agrônomo de Campinas

Prof. Dr. BERNARDO DE ALMEIDA HALFELD VIEIRA (Participação Presencial)
Laboratório de Quarentena / Embrapa Meio Ambiente

Botucatu, 26 de fevereiro de 2024.

*Dedico este trabalho ao meu avô Sávio
Feixeira de Carvalho (in memoriam).*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Márcia Maria de Carvalho e Danilo Carvalho, pela a oportunidade de sair de casa em busca de um futuro melhor, pela paciência e compreensão do meu distanciamento durante os sete anos de estudos e dedicação.

Aos meus irmãos, Valmir, Maria Eduarda e Vívian pela paciência e compreensão do meu distanciamento durante os sete anos de estudos e dedicação.

À minha avó Raimunda de Carvalho Vargas, por tanto se importar comigo e muitas das vezes ter agido como uma mãe, contribuindo para a minha formação pessoal.

Aos colegas de estudos, Cíntia, Guilherme, Marcos Pedrosa e Fernanda, pela contribuição com as atividades acadêmicas, principalmente por possibilitar momentos de descontração e bate papo.

À Flávia Rodrigues Alves Patrício, pela a oportunidade de realizar pesquisa junto ao laboratório de fitopatologia

À professora Renate Krause e ao professor Gilberto Raetano, pelos ensinamentos e contribuição na minha formação.

Ao meu orientador, Wagner Bettiol, pela confiança em meu trabalho e por ter contribuído ao meu desenvolvimento profissional e acadêmico.

A todos que contribuíram para a realização da parte prática do trabalho, especialmente ao Abraão e Antônio.

Aos funcionários da Embrapa Meio Ambiente, Laboratório de Microbiologia Ambiental (LMA) por todo apoio para o desenvolvimento dos experimentos, especialmente à Neusa Domingos, Rosely e Thayne.

As pessoas especiais do LMA: Letícia (Pingo), Daniel Eiji, Rafael, Hélio, Gabriela e Matteus.

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

"Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente, mas o que melhor se adapta às mudanças."

DARWIN, C. A origem das espécies por meio de seleção natural. 1. ed. São Paulo: Ubu editora, 2018. p. 800

RESUMO

Os probióticos utilizados para o equilíbrio da microbiota intestinal são compostos por bactérias que proporcionam enriquecimento a microbiota nativa, por consequência, estimulam a produção de compostos metabólicos que suprimem agentes patogênicos. Diante disso, o presente estudo avaliou o potencial de probióticos utilizados na avicultura em promover o crescimento da alface e controlar *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum* nas culturas da alface e da soja. Foram utilizados quatro probióticos formulados com *Bacillus* e outras bactérias benéficas (*Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus acidilactici*), o Colostrum[®] BIO 21 Líquido, Colostrum[®] BIO 21 MIX, Colostrum[®] BS, Colostrum[®] BS Líquido. Para a condução dos experimentos de promoção de crescimento foram utilizados os probióticos Colostrum[®] BIO 21 Líquido, Colostrum[®] BIO 21 MIX, Colostrum[®] BS, Colostrum[®] BS Líquido e testemunha. Nos experimentos foram utilizadas duas metodologias, sendo uma com a aplicação dos probióticos misturados no substrato antes da sementeira das sementes e aplicação via drench em mudas após a emergência. Por apresentarem os melhores resultados nos experimentos anteriores os probióticos Colostrum[®] BIO 21 MIX e Colostrum[®] BS foram aplicados em mudas pós-emergência e mudas transplantadas em vasos, com tratamentos nas concentrações 30; 22,5; 15 e 7,5 g/l. Nas mudas de alface com 30 dias de idade foram avaliadas: altura da parte aérea (cm), massa fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular (g), volume do sistema radicular (ml) e comprimento do sistema radicular (cm). Os experimentos foram montados em blocos casualizados, com quatro repetições. As médias foram comparadas pelo teste Tukey ($p < 0,05$). Os probióticos Colostrum[®] BIO 21 Líquido e Colostrum[®] BS Líquido foram utilizados nos experimentos para o controle de *R. solani* e *S. sclerotiorum* nas culturas da alface e da soja. No desenvolvimento dos estudos, os probióticos Colostrum[®] BIO 21 Líquido e Colostrum[®] BS Líquido foram diluídos para atingir a concentração de $1,0 \times 10^7$ UFC/ml. Os experimentos conduzidos com a cultura da alface, foram montados com mudas de 20 dias de idade, em que os tratamentos foram representados pela aplicação do Colostrum[®] BIO 21 Líquido e Colostrum[®] BS Líquido 24 horas antes da inoculação do patógeno (preventivo) e simultaneamente a inoculação do patógeno e testemunha sob incubação em câmara úmida em ambiente controlado com fotoperíodo de 12 horas a 22 °C. Nos experimentos conduzidos com a cultura da soja, foi utilizado o método de folha destacada, em que os tratamentos também foram representados pela aplicação de Bio 21 líquido e BS líquido 24 horas antes da inoculação do patógeno (preventivo) e simultaneamente a inoculação do patógeno, conduzidos em ambiente controlado com fotoperíodo de 12 horas a 22 °C. *R. solani* e *S. sclerotiorum* foi utilizado o pacote Pliman do software R[®] para quantificação das lesões. Ambos experimentos foram montados em blocos casualizados, com quatro repetições. As médias foram comparadas pelo teste Tukey ($p < 0,05$). Nos resultados de promoção de crescimento, o probióticos Colostrum[®] BIO 21 MIX e Colostrum[®] BS apresentaram significativa eficiência em incrementar biomassa em alface, aumentando a produção das variáveis altura da planta, volume da raiz, massa fresca e seca da parte e massa fresca e seca da raiz cinco vezes mais que a testemunha e os probióticos Colostrum[®] BIO 21 Líquido e Colostrum[®] BS Líquido, independentemente do método de aplicação. Os probióticos Colostrum[®] BIO 21 Líquido e Colostrum[®] BS Líquido não apresentaram eficiência no controle de *R. solani* e *S. sclerotiorum* em ambos experimentos conduzidos,

apresentando resultados de incidência e severidade estatisticamente semelhante a testemunha inoculada. Deste modo, no presente estudo, observou-se que os probióticos foram eficientes na promoção de crescimento de plantas de alface, mas não apresentaram eficiência no controle de *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*.

Palavras-chave: probióticos; controle biológico; *Rhizoctonia solani*; *Sclerotinia sclerotiorum*.

ABSTRACT

The probiotics used for balancing the intestinal microbiota consist of bacteria that enrich the native microbiota, consequently stimulating the production of metabolic compounds that suppress pathogens. In this context, the present study evaluated the potential of probiotics used in poultry farming to promote lettuce growth and control *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia sclerotiorum* in lettuce and soybean crops. Four probiotics formulated with *Bacillus* and other beneficial bacteria (*Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus acidilactici*) were used: Colostrum® BIO 21 Liquid, Colostrum® BIO 21 MIX, Colostrum® BS, Colostrum® BS Liquid. For the growth promotion experiments, the probiotics Colostrum® BIO 21 Liquid, Colostrum® BIO 21 MIX, Colostrum® BS, Colostrum® BS Liquid, and a control group were used. Two methodologies were employed in the experiments, one involving the application of probiotics during seeding mixed with the substrate and application via drench on post-emergence seedlings. Due to their favorable results in previous experiments, the probiotics Colostrum® BIO 21 MIX and Colostrum® BS were applied to post-emergence seedlings and transplanted seedlings in pots, with treatments at concentrations of 30, 22.5, 15, and 7.5 g/l. The evaluation of various parameters such as above-ground height (cm), fresh and dry mass of the above-ground and root systems (g), root system volume (ml), and root system length (cm) was conducted for lettuce seedlings at 30 days of age. The experiments were arranged in a randomized block design with four replications, and means were compared using the Tukey test ($p < 0.05$). Colostrum® BIO 21 Liquid and Colostrum® BS Liquid were used in experiments to control *R. solani* and *S. sclerotiorum* in lettuce and soybean crops. The probiotics were diluted to achieve a concentration of 1.0×10^7 CFU/ml. In lettuce experiments, 20-day-old seedlings were used, and treatments included the application of Colostrum® BIO 21 Liquid and Colostrum® BS Liquid 24 hours before pathogen inoculation (preventive), simultaneously with pathogen inoculation, and a control group under controlled conditions with a 12-hour photoperiod at 22°C. After four days, the incidence of *S. sclerotiorum* quantified by the number of dead plants and the severity of *R. solani* using a scale from 1 to 4, where 1 represents live plants, 2 indicates lesions on base leaves, 3 signifies lesions advancing to secondary leaves, and 4 represents dead plants were evaluated. For soybean experiments, the detached leaf method was employed, with treatments involving the application of Bio 21 Liquid and BS Liquid 24 hours before pathogen inoculation (preventive) and simultaneously with pathogen inoculation, conducted in controlled conditions with a 12-hour photoperiod at 22°C. After four days, photographic records of detached leaves were taken, and the Pliman package in the R® software was used to quantify lesions' area caused by *R. solani* and *S. sclerotiorum*. Both experiments were arranged in a randomized block design with four replications, and means were compared using the Tukey test ($p < 0.05$). In the growth promotion results, Colostrum® BIO 21 MIX and Colostrum® BS probiotics showed significant efficiency in increasing lettuce biomass, enhancing variables such as plant height, root volume, fresh and dry mass of both above-ground and root parts, five times more than the control group and Colostrum® BIO 21 Liquid and Colostrum® BS Liquid, regardless of the application method. However, Colostrum® BIO 21 Liquid and Colostrum® BS Liquid did not demonstrate efficiency in controlling *R. solani* and *S. sclerotiorum* in both conducted experiments, showing incidence and severity results statistically similar to the inoculated control

group. Thus, in the present study, it was observed that the probiotics did not demonstrate efficiency in controlling *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia sclerotiorum*. However, they exhibit significant potential in promoting the growth of lettuce crops.

Keywords: probiotics; biological control; *Rhizoctonia solani*; *Sclerotinia sclerotiorum*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Esquema do experimento para o controle de mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) e queima da saia (*Rhizoctonia solani*) em mudas de alface43
- Figura 2 - Placas de Petri plástica com 15 cm de diâmetro preparadas para o experimento com folhas destacadas44
- Figura 3 – Esquema do experimento para o controle de mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) e queima da saia (*Rhizoctonia solani*) em folhas destacadas de soja45
- Figura 4 - Mudas de alface com trinta dias de idade, após a aplicação dos probióticos Bio 21 pó, BS pó, Bio 21 L e BS L via substrato de semeadura, para observar o efeito promotor no desenvolvimento de plantas de alface cultivar Vanda. (a) Experimento 1, (b) Experimento 2 e (C) experimento 3.....48
- Figura 5 - Mudas de alface 21 dias após a aplicação semanal dos probióticos Bio 21 pó, BS pó, Bio 21 L e BS L via drench em substrato indicando o efeito na promoção do desenvolvimento de plantas de alface cultivar Vanda. (a) Experimento 1 e (b) experimento 2.....51
- Figura 6 - Efeito do probiótico BIO 21 pó aplicado semanalmente em mudas no desenvolvimento das variáveis altura, comprimento e volume da raiz em plantas de alface cultivar Vanda53
- Figura 7 – Efeito do probiótico BIO 21 pó aplicado semanalmente mudas no desenvolvimento das variáveis massa fresca e seca da parte aérea e da raiz em plantas de alface cultivar Vanda54
- Figura 8 – Efeito do probiótico BS pó aplicado semanalmente em mudas no desenvolvimento das variáveis altura, comprimento e volume da raiz em plantas de alface cultivar Vanda55
- Figura 9 - Efeito do probiótico BS pó aplicado semanalmente mudas no desenvolvimento das variáveis massa fresca e seca da parte aérea e da

raiz em plantas de alface cultivar Vanda	56
.....
Figura 10 - Mudanças de alface aos 30 dias de idade após a aplicação semanal, via drench em substrato, dos probióticos Bio 21 pó, BS pó, nas dosagens 0, 7,5, 15, 22, 5 e 30 g/L para avaliar o efeito no desenvolvimento de plantas de alface cultivar Vanda. (a) Experimento Bio 21 pó e (b) Experimento BS pó.....	57
Figura 11 – Efeito do probiótico BIO 21 pó aplicado via drench em mudas transplantadas no desenvolvimento das variáveis altura, comprimento e volume da raiz em plantas de alface cultivar Vanda	59
.....
Figura 12 – Efeito do probiótico BIO 21 pó aplicado via drench em mudas transplantadas no desenvolvimento das variáveis massa fresca e seca da parte aérea e da raiz em plantas de alface cultivar Vanda	60
.....
Figura 13 – Efeito do probiótico BS pó aplicado via drench em mudas transplantadas no desenvolvimento das variáveis altura, comprimento e volume da raiz em plantas de alface cultivar Vanda	61
.....
Figura 14 – Efeito do probiótico BS pó aplicado via drench em mudas transplantadas no desenvolvimento das variáveis massa fresca e seca da parte aérea e da raiz em plantas de alface cultivar Vanda	62
.....
Figura 15 - Mudanças de alface aos 30 dias após o transplante e aplicação semanal via drench dos probióticos Bio 21 pó, BS pó, para avaliar o desenvolvimento de plantas de alface cultivar Vanda. (a) Experimento Bio 21 pó e (b) Experimento BS pó.....	63
Figura 16 - Efeito dos probióticos BIO 21 líquido e BS líquido no controle da severidade da queima-da-saia (<i>Rhizoctonia solani</i>) da alface, da primeira vez em que o experimento foi conduzido.....	65
Figura 17 - Efeito dos probióticos BIO 21 líquido e BS líquido no controle da severidade da queima-da-saia (<i>Rhizoctonia solani</i>) da alface, da segunda vez em que o experimento foi conduzido.....	65
Figura 18 - Efeito dos probióticos Bio 21 líquido e BS líquido no controle da incidência de mofo branco (<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>) da alface.....	66
Figura 19 - Efeito dos probióticos Bio 21 líquido e BS líquido no controle da severidade da mela da soja (<i>Rhizoctonia solani</i>) na cultura da soja.....	67

Figura 20 - Efeito dos probióticos Bio 21 líquido e BS líquido no controle da incidência do mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) na cultura da soja.....69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição dos probióticos utilizados nos estudos	36
Tabela 2 - Concentração mínima por bactéria Probiótica	37
Tabela 3 – Efeito dos probióticos Bio 21 pó, BS pó, Bio 21 L e BS L aplicados no substrato de semeadura no desenvolvimento de plantas de alface cultivar Vanda.....	47
Tabela 4 – Efeito dos probióticos Bio 21 pó, BS pó, Bio 21 L e BS L, em aplicações semanais via drench, no desenvolvimento de plantas de alface cultivar Vanda. Experimentos 1 e 2.....	50

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DE LITERATURA	26
2.1	CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS	26
2.2	<i>BACILLUS</i> COMO AGENTE DE CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS E PROMOTOR DE CRESCIMENTO DE PLANTAS	27
2.3	O USO DE PROBIÓTICOS PARA O CONTROLE DE DOENÇAS	30
2.4	SCLEROTINIA SCLEROTIORUM E RHIZOCTONIA SOLANI	33
3	MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1	MICROORGANISMOS UTILIZADOS	35
3.2	CULTURAS E SUBSTRATOS UTILIZADOS	37
3.3	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DOS PROBIÓTICOS NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE ALFACE	38
3.3.1	Efeito dos probióticos aplicados no substrato de semeadura da cultura na promoção de crescimento	38
3.3.2	Efeito dos probióticos aplicados via drench em mudas de alface	39
3.3.3	Experimentos de promoção de crescimento em vasos com aplicações no transplântio das mudas e via drench	40
3.3.4	Análise estatística	41
3.4	CONTROLE DE MOFO BRANCO (<i>SCLEROTINIA SCLEROTIORUM</i>) E QUEIMA DA SAIA (<i>RHIZOCTONIA SOLANI</i>) EM MUDAS DE ALFACE	41
3.5	CONTROLE DE MOFO BRANCO (<i>SCLEROTINIA SCLEROTIORUM</i>) E MELA DA SOJA (<i>RHIZOCTONIA SOLANI</i>) EM FOLHAS DE SOJA DESTACADAS	43
4	RESULTADOS	46
4.1	Avaliação do potencial dos probióticos na promoção de crescimento de alface.	46
4.1.1	Efeito dos probióticos aplicados no substrato de semeadura da cultura na promoção de crescimento	46
4.1.2	Efeito dos probióticos aplicados via drench em mudas de alface	49

4.1.3	Experimentos de promoção de crescimento em vasos com aplicações no transplântio das mudas e via drench.....	58
4.2	CONTROLE DE MOFO BRANCO (SCLEROTINIA SCLEROTIORUM) E QUEIMA DA SAIA (RHIZOCTONIA SOLANI) EM MUDAS DE ALFACE.....	64
4.2	CONTROLE DE MOFO BRANCO (SCLEROTINIA SCLEROTIORUM) E MELA DA SOJA (RHIZOCTONIA SOLANI) EM FOLHAS DE SOJA DESTACADAS	66
5	DISCUSSÃO.....	69
6	CONCLUSÕES.....	69
	REFERÊNCIAS	75

1 INTRODUÇÃO

O solo é um organismo vivo composto por uma diversidade de mesorganismos, macrorganismos e microrganismos, que interagem com as plantas e com o ambiente. O conhecimento da comunidade microbiana presente nos solos é de grande importância para a produção de alimentos e equilíbrio biológico. Os microrganismos beneficiam o desenvolvimento dos vegetais, tanto pela promoção de crescimento das plantas, como pela mineralização da matéria orgânica e ciclagem de nutrientes, atuando também na melhoria da estrutura do solo (Verhoef, 2004). No entanto, a microbiota do solo também é constituída por microrganismos fitopatogênicos, que são aqueles com capacidade de causar doenças em plantas. Os fitopatógenos habitantes do solo causam doenças em plantas com consequente danos à produção causando prejuízos econômicos. São incluídos nesse grupo: os fungos, os oomicetos, as bactérias, os nematoides e os vírus (Correia; Michereff, 2018).

Os fungos, juntamente com os oomicetos, constituem o maior grupo de fitopatógenos habitantes do solo responsáveis por causar doenças em plantas, tendo diversas espécies dos gêneros *Cylindrocladium*, *Fusarium*, *Macrophomina*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Sclerotium*, *Thielaviopsis* e *Verticillium* que atacam um grande número de plantas. Alguns gêneros de bactérias, como *Agrobacterium*, *Pectobacterium* e *Ralstonia*, também causam doenças radiculares. As doenças associadas a esses fitopatógenos são: murchas vasculares, podridões radiculares, podridões de sementes, tombamento de plântulas e podridões moles (Michereff *et al.*, 2005).

Associados às populações de microrganismos fitopatogênicos, no solo existem populações de microrganismos antagonistas que exercem o controle biológico natural de doenças a partir de complexos mecanismos de interação que inibem ou reduzem o desenvolvimento do fitopatógeno e ou o progresso da doença, como: antibiose, competição, parasitismo, indução de resistência e predação. Dentre esses, alguns são conhecidos e utilizados como ferramenta de controle biológico. Espécies bacterianas dos gêneros *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Burkholderia* e *Agrobacterium*, além de espécies fúngicas como *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Gliocladium*, *Candida* e *Coniothyrium* (Bettiol, 2011; Fravel, 2005; Pal; Gardener, 2006) são importantes agentes de biocontrole.

No atual cenário agrícola, a tendência é que a adoção dos agentes de controle biológico seja crescente, em decorrência da exigência por técnicas que agridam menos o ambiente e pela necessidade de redução de agrotóxicos que levam a seleção de fitopatógenos resistentes, tornando o seu uso ineficiente (Köhl *et al.*, 2019; Pannullo *et al.*, 2018). Diante disso, a busca por novos agentes que contribuem para o desenvolvimento do controle biológico é de grande importância, tendo em destaque o aproveitamento de produtos já presentes no setor agropecuário, tais quais os probióticos utilizados no setor animal.

Dentro dessa linha de pesquisa, os produtos probióticos compostos por microrganismos são conhecidos na medicina por balancear a microbiota intestinal. São comumente utilizados para contribuir com o equilíbrio do ecossistema intestinal, sendo explorados para proteção contra doenças relacionadas ao sistema intestinal. Por exemplo, no setor animal os probióticos são utilizados para o controle da bactéria *Salmonella* spp. (Raposo, Defensor, Grahl, 2019). Os microrganismos utilizados nos probióticos são espécies de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Saccharomyces*, *Streptococcus* e *Bacillus* (Plaza-Dias *et al.*, 2019; Khaneghah *et al.*, 2020).

As bactérias do gênero *Bacillus* são excelentes agentes de controle biológico e foram relatadas controlando fungos fitopatogênicos, incluindo *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum* (Gao *et al.*, 2013; Peng *et al.*, 2013). Sua ação contra esses fitopatógenos pode ocorrer por meio da ação antagônica direta pelos mecanismos de antibiose, pela produção de compostos antimicrobianos como surfactinas, iturinas e fengicinas (Ongena *et al.*, 2005), na competição por espaço e nutrientes e na produção de compostos voláteis. Assim como, atuam indiretamente pela indução de resistência do hospedeiro, fortalecendo sua defesa ao ataque de fitopatógenos (Lanna Filho *et al.*, 2010; Leelasuphakul *et al.*, 2008).

As bactérias do gênero *Lactobacillus* são reconhecidamente importantes agentes probióticos. Esses organismos também são capazes de proteger os organismos contra patógenos, por meio da competição por nutrientes e espaço e pela produção de metabólitos como: ácidos graxos, bacteriocinas, espécies reativas de oxigênio (Vine *et al.*, 2006), que atuam na supressão da colonização ou do crescimento dos microrganismos patogênicos. Devido a isso, os probióticos vêm sendo estudados para o manejo de doenças de plantas, onde o controle de *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium latenicum*, *Alternaria brassicicola*, *A. alternata* e *Phytophthora* são relatados (Alaoui *et al.*, 2021; Guimarães *et al.*, 2018).

Considerando que, os probióticos possuem características que promovem o crescimento das plantas e controlam fitopatógenos, o presente trabalho teve como objetivos avaliar a eficiência dos probióticos Colostrum® BIO 21 Líquido, Colostrum® BIO 21 MIX, Colostrum® BS, Colostrum® BS Líquido, com *Bacillus subtilis* na composição, em promover o crescimento de plantas e em controlar os fungos *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Controle biológico de doenças de plantas

O controle biológico de doenças de plantas é a “redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno, realizada por ou através de um ou mais organismos que não o homem” (Cook; Baker, 1983). Em uma designação prática, Bettiol (1991) conceitua controle biológico como “o controle de um microrganismo por meio de outro microrganismo”.

O sucesso do controle biológico depende das interações antagônicas e dos mecanismos de ação dos microrganismos utilizados, podendo, ao mesmo tempo, apresentarem um complexo de mecanismos de ação (Bettiol *et al.*, 2009). Os agentes de controle biológico, em condições de campo atuam principalmente de forma combinada e sinérgica, atuando através de uma variedade de desses mecanismos para reduzir a expressão de doenças nas plantas (Köhl *et al.*, 2019).

Diante disso, são utilizadas estratégias que visam introduzir ao sistema agrícola condições semelhantes às que ocorrem na natureza, como no caso do uso de microrganismos antagônicos aos fitopatógenos que apresentam um complexo de mecanismos de ação. As interações antagônicas destes microrganismos compreendem nos mecanismos de antibiose, competição, parasitismo e predação. Além disso, os microrganismos são capazes de ativar mecanismos de defesa natural das plantas (Bedendo *et al.*, 2011).

A antibiose consiste na produção de metabólitos, por microrganismos, que inibem ou impedem o desenvolvimento dos indivíduos de uma população. Na competição, o antagonista se desenvolve mais eficientemente que o patógeno, através do sucesso da competição por espaço, nutrientes e oxigênio no sítio de infecção. O parasitismo é o processo em que o microrganismo é denominado como hiperparasita, pois parasita patógenos de plantas para a obtenção de nutrientes. A indução de defesa é um processo manifestado pela planta, pois microrganismos ou metabólitos expressam genes latentes de resistência presentes no hospedeiro (Bedendo *et al.*, 2011; Bettiol, 1991).

As bactérias e os fungos possuem papel fundamental no controle biológico de doenças de plantas, sendo as principais espécies dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Trichoderma* (Lopes, 2009). Atualmente, *Bacillus* e *Trichoderma* são exemplos de

agentes de controle biológico mais utilizados e com produtos registrados no Ministério da Agricultura (MAPA) voltados para o controle de doenças radiculares e foliares em diversas culturas. Esses agentes são indicados para o controle de fitopatógenos, incluindo *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Phakopsora pachyrhizi*, *Colletotrichum truncatum*, *Corynespora cassiicola* e *Hemileia vastatrix* entre outros (Agrofit, 2022).

2.2 *Bacillus* spp. como agentes de controle biológico de doenças e promotores de crescimento de plantas

O gênero *Bacillus* pertence ao Filo Firmicutes, Classe Bacilli, da ordem Bacillales e da família Bacillaceae. As bactérias desse gênero possuem forma de bastonete e são gram-positivas, podem ser aeróbias obrigatórias ou anaeróbias facultativas, são formadoras de endósporos e tem a capacidade de produzirem antibióticos e enzimas extracelulares (Gordon *et al.*, 1973; Stragier; Losick, 1996).

As bactérias do gênero *Bacillus* são habitantes do solo e fazem parte da população microbiana da rizosfera e do rizoplano, possuindo capacidade de colonizar o filoplano e os tecidos internos das plantas, onde se estabelecem e exercem ação antagônica sobre os fitopatógenos. Em condições adversas produzem endósporos, uma estrutura de resistência que permite a sobrevivência em ambientes diversificados e resistência às condições adversas, além de habitar ambientes extremos, como geleiras e desertos (Grigoletti Júnior *et al.*, 2000; Lanna Filho *et al.*, 2010).

Bacillus spp. são excelentes agentes de controle biológico, pois apresentam ação antagônica direta sobre fitopatógenos. Esses organismos agem por meio da antibiose, pela produção de compostos antimicrobianos como surfactinas, iturinas e fengicinas (Ongena *et al.*, 2005), competição por espaço e nutrientes e na produção de compostos voláteis. Assim como, atuam indiretamente pela indução de resistência do hospedeiro, fortalecendo sua defesa ao ataque de fitopatógenos (Lanna Filho *et al.*, 2010; Leelasuphakul *et al.*, 2008).

Na antibiose, os compostos antimicrobianos apresentam diferenças quanto a sua atividade biológica, em que as iturinas e fengicinas atuam na inibição do crescimento de diversos fungos fitopatogênicos. Enquanto que, as surfactinas apenas apresentam atividade antifúngica em efeito sinérgico com outro composto

antimicrobiano, como no caso da Iturina A. Sobre os efeitos antibacterianos, as iturinas e fengicinas possuem ação contra algumas espécies de *Xanthomonas* e as sulfarctinas apresentam baixa atividade contra esse grupo fitopatogênico (Etesami *et al.*, 2023).

Silva Junior *et al.* (2023) comprovaram a eficiência de *Bacillus velezensis* B157 no controle de alternariose (*Alternaria linariae*) do tomateiro em mais de 90%, constatando produção de compostos antimicrobianos das famílias iturinas e fengicinas. Bhakat *et al.* (2023) observaram que *Bacillus* sp. K7 produz diferentes isoformas de surfactinas, iturinas e fengicinas na presença de *Colletotrichum siamense* causando danos severos à parede celular do micélio, seguido de extravasamento do conteúdo celular.

Em relação a indução de resistência do hospedeiro, *Bacillus* spp. atuam na rota da biossíntese de ácido jasmônico e etileno (Lanna Filho *et al.*, 2010). Adrees *et al.* (2019) comprovaram que *B. subtilis* e *B. megaterium* induziram a resistência sistêmica induzida em plantas de algodão contra *Macrophomina phaseolina*, agente causal da podridão radicular, comprovada pelo aumento da produção de compostos fenólicos totais, das enzimas peroxidases, polifenoloxidasas e fenilalanina amônia liase. *Bacillus velezensis* YYC induziu a ISR na cultura do tomateiro a *Ralstonia solanacearum*, agente causal da murcha bacteriana (Yan *et al.*, 2022).

Espécies de *Bacillus* também são eficientes no controle biológico de nematoides. *Bacillus* sp., isolado das raízes de abacaxi, reduziram as populações do *Rotylenchulus reniformis* nas cultivares MD2 e Vitória em 59,6 e 53,3%, respectivamente (Soler *et al.*, 2021). Cao *et al.* (2019) comprovaram que *B. subtilis* Bs-1 reduziu a taxa de eclosão dos ovos de *Meloidogyne incognita* e apresentou alta eficiência no aumento da mortalidade de juvenis de segundo estágio, assim como, apresentou forte ação de repelência contra esses indivíduos, em consequência, reduziu significativamente a produção de galhas em raízes de pepino.

Bacillus spp. também agem como rizobactérias promotoras de crescimento (RPCPs) e atuam na promoção do crescimento vegetal. A promoção de crescimento ocorre na forma direta, com atuação na melhoria nutricional com o aumento da solubilização de nutrientes e fixação de nitrogênio, assim como, pela produção de fitohormônios (auxina, citocinina e giberelina). De forma indireta, essas bactérias atuam na proteção de plantas, pela modificação do ambiente e consequente interferência no desenvolvimento de fitopatógenos, proporcionando melhor sanidade

à cultura. Essas formas de atuação colaboram com o maior desenvolvimento das raízes e da parte aérea das plantas (Manjula; Podile, 2005; Tsavkelova *et al.*, 2006; Persello-Cartieaux *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2018).

Meng *et al.* (2016) relataram que *B. velezensis* BACO3 promoveu o crescimento do rabanete, aumentando os pesos das matérias fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular. A bactéria foi aplicada na concentração de 5×10^4 UFC/mL em diferentes estágios da cultura e frequência de aplicação. A inoculação de BACO3 10 dias após o plantio aumentou o peso das folhas e do sistema radicular, enquanto que, a aplicação da bactéria mais de uma vez foi mais. Além disso, a BACO3 produziu auxina e NH_3 , bem como apresentaram atividade de ACC-deaminase, substâncias essenciais para o crescimento das plantas.

A promoção de crescimento induzida por espécies de *Bacillus* pode levar a rápida emergência das plântulas (Ferreira *et al.*, 2021). O tratamento de sementes de milho pipoca IAC 367 com *B. velezensis* AP-03 e *Bacillus* spp. AP-210 promoveram incremento na emergência, índice de SPAD clorofila, altura, massa seca da parte aérea e comprimento radicular. Chagas Junior *et al.* (2021) também relataram que a inoculação de sementes de soja com *Bacillus* proporcionou aumento no crescimento das plantas, na altura da planta, do número de entrenós, comprimento das raízes e das massas secas da parte aérea e radicular.

As principais espécies de *Bacillus* envolvidas na promoção de crescimento de plantas e no controle biológico de doenças são: *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis* e *B. thuringiensis*, que agem através dos mais diversos mecanismos de ação (Lopes *et al.*, 2018). Diante disso, são amplamente exploradas para produção e comercialização de bioprodutos, com formulações classificadas em “múltiplos modos de ação sobre os patógenos”. Junto a isso, as características de sobrevivência em condições adversas e a utilização de meios baratos para a multiplicação torna este gênero um potente agente para exploração biotecnológica (Clemente *et al.*, 2016).

É importante também ressaltar que, devido as suas características aplicadas ao controle biológico de doenças, as bactérias *Bacillus* spp. são utilizadas como probióticos na produção animal. Com destaque aos metabolitos secretados por essas bactérias com ação probiótica dos quais: os compostos antimicrobianos (como bacteriocinas), os antibióticos (como surfactinas) e enzimas extracelulares que degradam carboidratos, lipídios e proteínas e auxiliam na digestão dos nutrientes

(Bernardeau *et al.*, 2017; Luise *et al.*, 2022). Bernardeau *et al.* (2017) também ressalta que por serem bactérias esporuladas, são interessantes para o mercado de probióticos, uma vez que, são resistentes a processos industriais e digestivos.

A produção de moléculas antimicrobianas e a tolerância a mudanças ambientais abruptas (como mudanças de temperatura, pressão, radiação ultravioleta, ativos químicos e físicos, umidade do ar e pH), permite que *Bacillus spp.* tenha resistência às condições ácidas do estômago e a presença de baixo pH nesse local. Por consequência, sejam eficientes em multiplicar e estabelecer no intestino e atuar na secreção de metabólitos secundários bioativos. Essas características tornam esse grupo de bactérias interessante para produção e manipulação em larga escala (Bernardeau *et al.*, 2017; Elisashvili *et al.*, 2019; Luise *et al.*, 2022). As principais espécies envolvidas na produção de probióticos são: *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. coagulans*, *B. amyloliquefaeciens* e *B. velezensis* (Ghelardi *et al.*, 2022; Luise *et al.*, 2022).

2.30 uso de probióticos para o controle de doenças

Os probióticos foram definidos por Fujii e Cook (1973) como "compostos que produzem resistência à infecção no hospedeiro, mas que não inibem o crescimento de microrganismos *in vitro*". Deste modo, os probióticos eram vistos como "compostos e/ou microrganismos com diferentes funções que contribuíam para a restauração, a manutenção ou o aprimoramento da saúde através de rotas não relacionadas ao antagonismo microbiano ou competição".

Devido a essas características, foi definido por Fuller (1989) como "microrganismos vivos utilizados na alimentação, que afetam benéficamente o animal hospedeiro por melhorar seu balanço microbiano intestinal". Desde então, tornou-se uma alternativa de suplementação alimentar, com objetivo de melhorar o equilíbrio da microbiota intestinal.

Além dos probióticos, os prebióticos são fontes de carboidrato não digeríveis que chegam intactos ao trato gastrointestinal e atuam na estimulação do crescimento e estabilidade de microrganismos intestinais benéficos. Por sua vez, um simbiótico é um produto que contém a junção dos prebióticos e probióticos, com a função de aumentar a sobrevivência dos probióticos durante a passagem no trato

gastrointestinal, principalmente em ambientes ácidos, garantindo a vantagem competitiva (Santos *et al.*, 2011).

As formulações probióticas devem apresentar uma série de requisitos para a sua comercialização, dentre as quais: possuir concentrações efetivas entre 10^8 a 10^{11} Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/ g de produto; ter rápida multiplicação após a ingestão para que iniba os patógenos; apresentar tolerância às enzimas salivares, ácidos estomacais e sais biliares no intestino delgado e ácido orgânico volátil no intestino grosso; não ser patogênico; e apresentar viabilidade e estabilidade por um longo período de tempo (Santos *et al.*, 2011).

As espécies microbianas envolvidas em formulações probióticas são bactérias do ácido láctico, como espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, leveduras como *Saccharomyces* e *Streptococcus* e algumas espécies de *Bacillus* (Plaza-Dias *et al.*, 2019; Khaneghah *et al.*, 2020). No gênero *Lactobacillus* estão compreendidas mais de 80 espécies reconhecidas, das quais, as mais utilizadas são: *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* e *L. casei*. São bactérias gram-positivas, não formadoras de esporos, desprovidas de flagelos, com formato bacilos ou cocobacilos, são anaeróbias ou aerotolerantes e tem temperatura ideal para multiplicação na faixa de 35-40 °C. Em *Bifidobacterium* estão compreendidas 30 espécies, das quais a mais importantes são: *B. longum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. animalis* e *B. infantis*. São bactérias gram-positivas, não formadoras de esporos, desprovidas de flagelos, catalase negativa e anaeróbios, com temperatura ideal para multiplicação na faixa de 37-41 °C (Santos *et al.*, 2011).

Comumente, esses microrganismos são utilizados para benefícios à saúde humana e saúde animal. Além disso, são capazes de proteger seu hospedeiro contra patógenos, através tanto da competição por nutrientes e espaço como pela produção de metabólitos, como: ácidos graxos, bacteriocinas, espécies reativas de oxigênio, que suprimem a colonização ou o crescimento dos microrganismos patogênicos (Vine *et al.*, 2006). Diante disso, possuem atuação, principalmente, no controle dos patógenos *Escherichia coli* e *Salmonella*.

As bactérias do ácido láctico também são encontradas ambientes agrícolas como na rizosfera, na filosfera e na endosfera (Liu *et al.*, 2014). Conforme Di Cagno *et al.* (2013) na filosfera a concentração dessas bactérias varia entre 10^2 e 10^4 UFC/g, e, além disso, de acordo com Fhoula *et al.* (2013), as bactérias do ácido láctico encontradas na rizosfera exibem atividade antimicrobiana.

Devido a essas características, os probióticos vêm sendo fonte de pesquisa para a agricultura, principalmente para o controle biológico de doença. Chen *et al.* (2020) isolaram *L. plantarum* CM-3 na cultura do morango que apresentou eficiência no controle do fungo *Botrytis cinerea*. Em testes *in vitro*, *L. plantarum* CM-3 nas concentrações de 10^6 a 10^9 UFC/ml limitou o crescimento micelial de *B. cinerea*, com reduções em 55, 69, 50 e 79%, respectivamente. A esporulação do fungo nas concentrações de 10^8 e 10^9 UFC/ml foi total, enquanto que, nas concentrações 10^6 e 10^7 a esporulação foi inibida em 35 e 52%, respectivamente. Em testes *in vivo*, na concentração de 10^9 UFC/ml, *L. plantarum* CM-3 reduziu a severidade e a incidência de mofo cinzento no morango e manteve a integridade dos frutos ao longo dos dias após a infecção do patógeno.

A avaliação da eficiência de bactérias probióticas está sendo aplicada em diferentes patossistemas. Barrios-Roblero *et al.* (2019) demonstraram que *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. pentosus* apresentaram atividade antifúngica contra *Collectotrichum gloeosporioides*, agente causal de antracnose em diferentes frutíferas, com redução de 60% e 100% na germinação de esporos e no crescimento micelial, respectivamente. Esses organismos também apresentam eficiência no controle de fitopatógenos habitantes do solo. *Lactobacillus* sp. e *Weissella* sp. reduziram o crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* em 81 e 60%, respectivamente. Na cultura do arroz, *R. solani* causa a queima-da-bainha e aplicações de *Lactobacillus* e *Weissella*, durante o transplântio, reduziu a severidade da doença em 50 e 30%, respectivamente (Akhtar *et al.*, 2023).

Lactobacillus inibiu o crescimento micelial e a germinação de esporos de *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium latenicum*, *Alternaria brassicicola*, *A. alternata* e *Phytophthora infestans*. A atividade antifúngica pode estar associada a produção de um amplo grupo de metabolitos, que inclui os ácidos orgânicos, compostos fenólicos, peróxido de hidrogênio, ácidos graxos, compostos proteicos, sendo os ácidos láctico, acético e fenil láctico as principais substâncias responsáveis por inibir a germinação de esporos e o crescimento micelial (Alaoui *et al.*, 2021; Guimarães *et al.*, 2018).

2.4 *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani*

Sclerotinia sclerotiorum é um fitopatógeno habitante do solo e sobrevive por um longo período de tempo, podendo permanecer no solo por mais de 10 anos, através da estrutura de resistência denominada escleródio. O escleródio é uma estrutura de formato irregular de coloração preta e dura, é originário da junção de micélios em massa compactada que são recobertas por uma camada de melanina, conferindo resistência ao patógeno (Sagata, 2010).

No campo, o fungo causa o mofo-branco e a doença ocorre em condições de clima ameno e úmido, podendo ser muito severa em temperaturas entre 15 e 21 °C. A alta umidade do ar e água livre nas plantas, por um determinado período de tempo, favorecem a germinação dos escleródios, dando início ao ciclo da doença (Hunter *et al.*, 1984; Jones, 1991). A germinação do escleródio é um fator determinante para o processo de infecção inicial das plantas e essa pode ocorrer de duas formas, tanto miceliogênica, ou seja, quando há a produção de micélio a partir do escleródio, ou carpogênica, pela produção do apotécio a partir do escleródio (Lobo Junior, 1999). Ambas as formas de germinação do escleródio são dependentes de fatores externos, considerando condições ambientais favoráveis e disponibilidade de nutrientes.

Quando existe limitação nutricional ocorre apenas a germinação carpogênica (Mcdonald; Boland, 2004; Subbarao, 1997). Para a germinação carpogênica os escleródios necessitam receber uma quantidade de luz suficiente. Juntamente com a ocorrência de temperaturas entre 8 a 16 °C formam os apotécios, que por sua vez, produzem e liberam uma grande quantidade de ascósporos no ar e são disseminados pelo vento para áreas produtoras de alface (Kohn, 1979; Tu, 1989). Caso contrário, com a germinação dos micélios são capazes de penetrar o tecido da planta sadia dando início a doença (Kohn, 1979; Tu, 1989). Segundo Pereira *et al.* (2015), a disseminação da doença a longa distância pode ocorrer através de sementes infectadas internamente com micélio dormente do fungo, ou até mesmo, por lotes de sementes infestados por escleródios.

O sintoma inicial da doença na cultura da alface é a murcha na planta, na sequência ocorre o amarelecimento, colapso generalizado e morte. As lesões nas plantas possuem um aspecto úmido e coloração castanho-claro ou escura, podendo haver a formação de micélio cotonoso nos tecidos mais velhos, em função do rápido

crescimento micelial, onde são formados um grande número de escleródios (Amorim *et al.*, 2016).

Rhizoctonia solani é um fitopatógeno habitante do solo e vive saprofiticamente na matéria orgânica do solo, possui uma ampla gama de hospedeiro, com cerca de 500 gênero botânicos (Mcnabb; Talbot, 1973). Segundo Adams (1988), *R. solani* tem hifas septadas, micélio castanho-claro a marrom, com presença de ramificação lateral em ângulo reto, ausência de conídios e produção de estruturas de resistência denominadas microescleródios.

No campo, o fungo causa queima-da-saia na alface e o desenvolvimento da doença ocorre em condições de clima amenos e úmido, com temperaturas de 15 a 25 °C, sendo mais agressivo em sua temperatura ótima de desenvolvimento a 25 °C (Grosch *et al.*, 2004; Tofoli; Domingues, 2017). A alta umidade do solo favorece a germinação dos escleródios e basidiósporos, ambos formam micélio e são responsáveis pelo início do processo infeccioso da doença, assim como, o micélio pode sobreviver por um determinado período de tempo em restos culturais ou serem disseminados (Sneh *et al.*, 1991). Os sintomas da doença na cultura da alface são observados inicialmente nas folhas mais velhas, que em contato direto com o patógeno no solo, apresentam as primeiras lesões em pequenos pontos marrom-claros nas nervuras tornando-se escurecida, necrosando e causando a queima total (Bedendo, 2018; Lopes *et al.*, 2010).

O controle de fitopatógenos habitantes do solo, consiste basicamente em utilizar as técnicas de manejo integrada com utilização de sementes saudas, de fungicidas, rotação de cultura (gramíneas), manejo da cultura (irrigação equilibrada, espaçamento, adubação), eliminação de plantas daninhas hospedeiras e/ou restos culturais e o uso da cobertura do solo (Lopes; Quezado-Duval, 1998). O controle pode ser otimizado pelo uso do agente de controle biológico, como *Trichoderma* e *Bacillus*, que apresentam bons resultados na redução do patógeno em campo (Meyer; Mazaro; Silva, 2019).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismos utilizados

Os isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani*, utilizados nos experimentos, fazem parte da coleção de cultura do Laboratório de Fitopatologia do Instituto Biológico de São Paulo, Campinas, SP. Os isolados foram repicados em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA), sendo as placas com os fungos utilizadas como inóculo para serem cultivados em grãos de trigo. Para este cultivo, 1 kg de trigo foram mergulhados em água por 15 minutos e, posteriormente, 250 g foram transferidos para sacos plásticos, onde foram autoclavados por 1 hora a 121°C. Os fungos foram mantidos a temperatura ambiente em sala de crescimento com fotoperíodo de 12 horas, após sete dias de crescimento foram armazenados sob refrigeração a -20 °C.

Como agentes de controle biológico foram utilizados produtos comerciais doados pela empresa BioCamp Ltda., Campinas, SP. Os quatro probióticos avaliados foram: Colostrum® BIO 21 Líquido, Colostrum® BIO 21 MIX, Colostrum® BS, Colostrum® BS Líquido, chamados a partir de agora de Bio 21 líquido, Bio 21 pó, BS pó e BS líquido, respectivamente (Tabela 1 e 2).

Tabela 1- Descrição dos probióticos utilizados nos estudos

Probiótico	Composição	Concentração	Fornecedor
Colostrum® BIO 21 Líquido	<i>Enterococcus faecium</i> (LOFU 84, LOFU 124, LOFU 140, LOFU 145, LOFU 146, LOFU 158) <i>Lactobacillus acidophilus</i> (LOFU 63) <i>Lactobacillus delbrueckii</i> (LOFU 65) <i>Lactobacillus plantarum</i> (LOFU 79, LOFU 83, LOFU 147) <i>Lactobacillus reuteri</i> (LOFU 18, LOFU 21, LOFU 22, LOFU 35, LOFU 48) <i>Lactobacillus salivarius</i> (LOFU 44) <i>Pediococcus acidilactici</i> (LOFU 57, LOFU 58, LOFU 82) <i>Bacillus subtilis</i> (LOFU 160)	1x10 ⁸ UFC/mL	Biocamp Laboratórios Ltda.
Colostrum® BIO 21 MIX (Formulado em pó)	<i>Enterococcus faecium</i> (LOFU 84, LOFU 124, LOFU 140, LOFU 145, LOFU 146, LOFU 158) <i>Lactobacillus acidophilus</i> (LOFU 63) <i>Lactobacillus delbrueckii</i> (LOFU 65) <i>Lactobacillus plantarum</i> (LOFU 79, LOFU 83, LOFU 147) <i>Lactobacillus reuteri</i> (LOFU 18, LOFU 21, LOFU 22, LOFU 35, LOFU 48) <i>Lactobacillus salivarius</i> (LOFU 44) <i>Pediococcus acidilactici</i> (LOFU 57, LOFU 58, LOFU 82) <i>Bacillus subtilis</i> (LOFU 160)	1x10 ⁸ UFC/g	Biocamp Laboratórios Ltda.
Colostrum® BS (Formulado em pó)	<i>Bacillus subtilis</i> (LOFU 160)	1x10 ⁸ UFC/g	Biocamp Laboratórios Ltda.
Colostrum® BS Líquido	<i>Bacillus subtilis</i> (LOFU 160)	1x10 ⁹ UFC/mL	Biocamp Laboratórios Ltda.

Tabela 2 - Concentração mínima por bactéria Probiótica

Bactéria Probiótica	Concentração mínima
<i>Bacillus subtilis</i>	1,0x10 ⁸ UFC/g ou mL
<i>Enterococcus faecium</i>	6,0x10 ⁸ UFC/g ou mL
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1,0x10 ⁸ UFC/g ou mL
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	1,0x10 ⁸ UFC/g ou mL
<i>Lactobacillus plantarum</i>	3,0x10 ⁸ UFC/g ou mL
<i>Lactobacillus reuteri</i>	5,0x10 ⁸ UFC/g ou mL
<i>Lactobacillus salivarius</i>	1,0x10 ⁸ UFC/g ou mL
<i>Lactobacillus acidilactici</i>	3,0x10 ⁸ UFC/g ou mL

Os probióticos BIO 21 pó e o BS pó também possuem em sua composição dióxido de silício, levedura seca de cana e leite em pó desnatado.

Os produtos foram utilizados tanto para avaliar o potencial como promotor de crescimento de alface e para o controle do mofo branco e da queima da saia em mudas de alface.

3.2 Culturas e substratos utilizados

As sementes das culturas da alface (*Lactuca sativa*) e da soja (*Glycine max* (L) Merrill), utilizadas nos experimentos, foram doadas pelas empresas Sakata Ltda e Syngenta Ltda. A cultivar utilizada para a condução dos experimentos com a cultura da alface foi a Vanda[®]. A alface cultivar Vanda[®] pode ser produzida durante todo o ano, apresenta ciclo precoce com duração de 55 dias, são folhosas grandes com coloração verde-clara brilhante e moderada crespicidade, além de, apresentarem talo grosso e sistema radicular vigoroso. Em relação a doenças, possui resistência a *Lettuce mosaic virus* - cepa II.

Para a condução dos experimentos com a cultura da soja foi utilizada a cultivar BMX Potência RR[®]. Essa cultivar é recomendada para área de várzea e apresenta alto potencial produtivo e ótima estabilidade produtiva. Com característica de crescimento indeterminado e porte alto, apresenta resistência a acamamento. Em

relação a doenças, possui resistência à podridão radicular de *Phytophthora* (raças 1, 3 e 4)

A semeadura da alface foi realizada no substrato Vivatto Slim Plus® (48% de umidade, 260 kg/m³ de densidade e pH 6) doado pela empresa Technes Agrícola Ltda.

3.3 Avaliação do potencial dos probióticos na promoção de crescimento de alface.

O estudo foi conduzido em casa de vegetação da Embrapa Meio Ambiente (22°43'36"S, 47°00'59"W), localizado no Município de Jaguariúna, no Estado de São Paulo. O clima na região é classificado como subtropical úmido (Cfa de acordo com a classificação de Köppen), com verões quentes e chuvosos e invernos frios e secos.

3.3.1 Efeito dos probióticos aplicados no substrato de semeadura da cultura na promoção de crescimento

O estudo foi realizado em triplicata, ao longo dos meses de fevereiro, março e abril de 2023, respectivamente. Vinte gramas de cada probiótico foram diluídos em 200 ml de água e incorporadas em 1 L de substrato, com homogeneização manual. Para tanto, o substrato foi colocado em sacos plásticos de 5 L e misturados por, aproximadamente, 30 minutos. Em seguida o substrato foi transferido para bandejas de 32 células (25 ml para cada célula) e realizada a semeadura da alface cultivar Vanda. As células das bandejas foram preenchidas até 1/3 de seu volume, foi colocada uma semente por célula sendo coberta com 0,5 cm de substrato. Em seguida, as bandejas foram cobertas com saco preto e incubadas por dois dias. O experimento foi realizado com cinco tratamentos, que consistiram na aplicação dos probióticos BIO 21 pó, BIO 21 líquido, BS pó e BS líquido, e a testemunha com água, na concentração de 1×10^7 UFC/ml ou g. O experimento foi organizado em delineamento blocos casualizados com quatro repetições.

Após dois dias da semeadura, as bandejas foram mantidas em casa de vegetação até que as mudas de alface atingissem 30 dias de idade. Durante esse período, as mudas foram irrigadas por aspersão em três intervalos com frequência de 3 horas e duração de 1,5 minutos cada intervalo. Quando necessário, foi realizado o controle de plantas daninhas manualmente. Após os 30 dias, as mudas de alface

tiveram suas raízes lavadas para avaliação das seguintes variáveis relacionadas à promoção de crescimento: altura da parte aérea (cm) massa fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular (g), o volume do sistema radicular (ml) e o comprimento do sistema radicular (cm). Para a obtenção da altura da parte aérea e comprimento da raiz foi utilizada uma régua graduada. Para a massa fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular foi utilizada uma balança semi-analítica e para o volume do sistema radicular foi utilizada uma proveta graduada de 10 mL, onde foi preenchido um volume de 6 mL de água e posteriormente era feita a imersão da raiz e o volume de água elevado foi contabilizado como o volume do sistema radicular.

3.3.2 Efeito dos probióticos aplicados via drench em mudas de alface

3.3.2.1 Aplicação dos probióticos via drench nas mudas de alface

O estudo foi realizado em duplicata durante os meses de maio e junho de 2023. Em ambos experimentos foi realizada a semeadura da alface em bandejas de 32 células (25 ml cada célula). Os experimentos foram organizados em delineamento blocos casualizados com quatro repetições. As células das bandejas foram preenchidas até 1/3 de seu volume, semeada uma semente por célula e recoberta com 0,5 cm de substrato. Em seguida, as bandejas foram cobertas com saco preto e incubadas por dois dias. Após 7 dias a emergência das plântulas, foram feitas aplicações semanais dos tratamentos BIO 21 pó, BIO 21 líquido, BS pó e BS líquido e água como testemunha até que completasse um total de quatro aplicações. Para isso, os probióticos foram diluídos a 1×10^7 UFC/ml ou g e aplicados célula a célula. Em cada muda de alface foram adicionados 3,10 ml dos probióticos diluídos com o auxílio da pipeta digital volumétrica de 10 ml.

A condução e as avaliações foram semelhantes às descritas anteriormente.

3.3.2.2 Aplicação semanal dos probióticos BIO 21 Pó e BS Pó

Por apresentarem os melhores resultados nos experimentos anteriores, neste estudo foram avaliados os probióticos BIO 21 pó e BS pó. Dois experimentos foram realizados durante os meses de julho e agosto de 2023, sendo um experimento conduzido para avaliar diferentes dosagens de BIO 21 pó e o outro experimento, com mesma finalidade, utilizando o BS pó. Nos experimentos foram estudadas as seguintes concentrações de probióticos: 0, 7,5, 15, 22,5 e 30 g/L de água. Para cada tratamento, a semeadura da alface foi feita em quatro parcelas com bandejas de 16 células (25 ml cada célula). Os experimentos foram organizados em blocos casualizados com quatro repetições. As células foram preenchidas até 1/3 de seu volume e realizada a semeadura de alface colocando uma semente por célula, sendo, posteriormente, coberta com 0,5 cm de substrato. Em seguida, as bandejas foram cobertas com saco preto e incubadas por dois dias. Após 7, 14, 21 e 28 dias da emergência foram feitas aplicações das doses de 0, 7,5, 15, 22,5 e 30 g/L dos probióticos nas mudas de alface. Para isso, as dosagens foram diluídas em um litro de água e aplicadas célula a célula em um volume de 3,10 ml, com o auxílio da pipeta digital volumétrica de 10 ml. No tratamento 0 g, referente a testemunha, foi adicionada somente água.

A condução e as avaliações foram semelhantes às descritas anteriormente.

3.3.3 Experimentos de promoção de crescimento em vasos com aplicações no transplantio das mudas e via drench

Dois experimentos iguais foram realizados para avaliar os probióticos BIO 21 pó e BS pó com aplicação nas concentrações de 0, 7,5, 15, 22, 5 e 30 g/L em mudas de alfaces com 30 dias transplantadas em vaso de 300 ml de solo contendo 3 g de NPK 10-10-10, durante os meses de agosto e outubro de 2023. Os experimentos foram montados em delineamento inteiramente casualizado. Duas mudas de alface foram transplantadas para vasos e, simultaneamente, tratadas com os probióticos nas concentrações de 0, 7,5, 15, 22, 5 e 30 g/L de água. Cada muda recebeu 3,10 ml, com o auxílio da pipita digital volumétrica de 10 ml. O procedimento foi repetido

semanalmente até que as plantas atingissem 21 dias de tratamento, totalizando quatro aplicações. No tratamento 0 g foi adicionada somente água.

A condução e as avaliações foram semelhantes às descritas anteriormente.

3.3.4 Análise estatística

Os dados das variáveis de promoção de crescimento dos experimentos foram submetidos a análise de variância e para comparação entre os tratamentos foi utilizado o teste de Tukey a 5 % de probabilidade, utilizando o software Sisvar®.

Nos experimentos com aplicação semanal dos probióticos Bio 21 pó e BS pó os dados das variáveis de promoção de crescimento foram submetidos a regressão quadrática, utilizando o software Excel®.

3.4 Controle de mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) e queima da saia (*Rhizoctonia solani*) em mudas de alface

Para os estudos de controle biológico das doenças mofo branco e queima da saia, em razão da aplicação ter sido por pulverização foram utilizados apenas os probióticos em líquido. Diante disso, foi um fator limitante para a aplicação dos probióticos em pó, uma vez que, devido a sua granulometria grossa ocorre o entupimento de bicos. A primeira etapa da pesquisa consistiu na aplicação dos probióticos BIO 21 líquido e BS líquido em dois experimentos, um com *Sclerotinia sclerotiorum* e o outro com *Rhizoctonia solani*, realizado no Laboratório de Microbiologia Agrícola “Raquel Ghini” da Embrapa Meio Ambiente. Para isso, sementes de alface foram semeadas em bandejas de 128 células com o substrato Vivatto®.

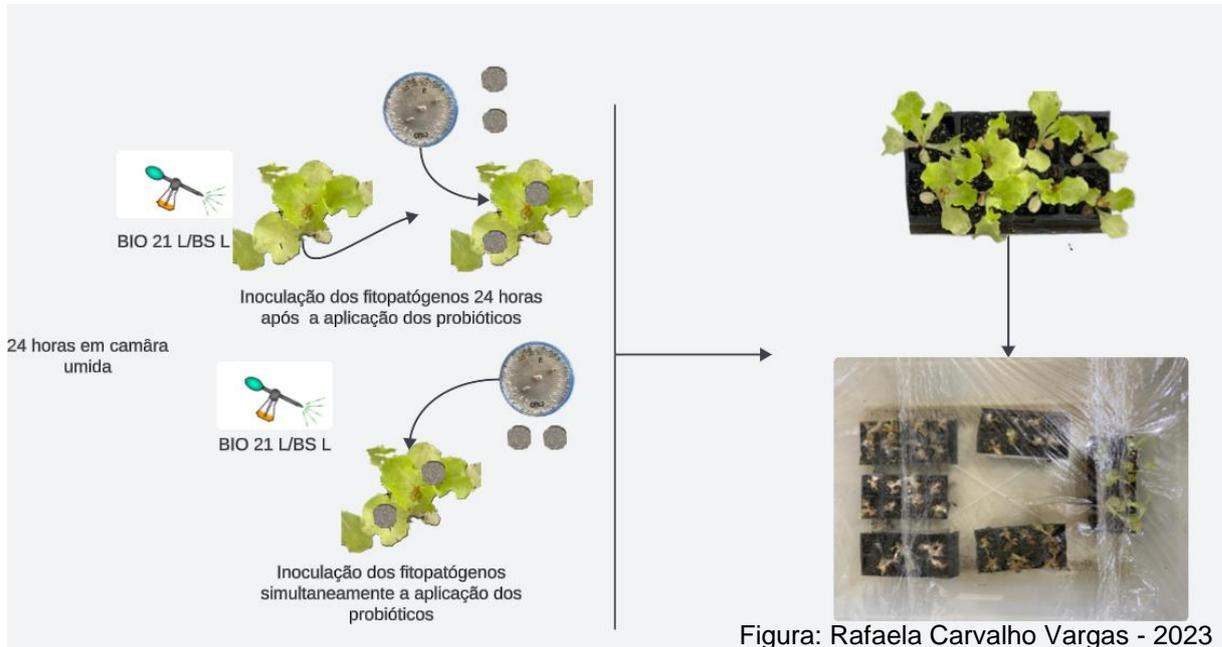
Mudas de alfaces com 20 dias foram tratadas individualmente com os probióticos Bio 21 líquido e BS líquido na concentração de 10^7 UFC ml⁻¹ e água destilada para a testemunha e testemunha não inoculada. A aplicação de Bio 21 líquido e BS líquido foi realizada 24 h antes e simultaneamente à inoculação do patógeno, a testemunha inoculada e testemunha não inoculada foram tratadas com água destilada, totalizando seis tratamentos com quatro repetições cada. O experimento foi instalado em blocos casualizados, em caixas plásticas envolvidas com

papel filme, com quatro repetições contendo oito mudas cada repetição, com as plantas mantidas em câmara úmida por 24 h para posterior inoculação do patógeno e conduzidas em sala de crescimento a 22 ± 2 °C com fotoperíodo de 12 h. A inoculação do patógeno foi realizada na parte superior das folhas de alface, utilizando discos de 8 mm de diâmetro com crescimento micelial do patógeno em meio BDA, provenientes dos grãos de trigo armazenados (Figura 1). Quatro dias após a inoculação, a incidência foi avaliada no ensaio com *S. sclerotiorum* devido ao alto grau de agressividade do patógeno e a severidade foi avaliada para *R. solani*. O experimento com *Rhizoctonia solani* foi realizado duas vezes.

A avaliação da incidência do mofo branco foi realizada contando o número de plantas mortas. Com este dado foi obtida a porcentagem da incidência da doença por tratamento. A avaliação da severidade da queima da saia foi realizada utilizando a escala de notas de 1 a 4, em que, 1-plantas vivas, 2-lesões nas folhas da base, 3-lesões avançando para as folhas secundárias e 4-plantas mortas, adaptado de Pinto et al. (2014). Os dados de severidade da queima-da-saia (*R. solani*) foram transformados para índice de doença, utilizando a fórmula $[(\sum \text{grau da escala} \times \text{frequência}) \times 100] / (\text{número total de plantas} \times \text{grau máximo da escala})$.

Os dados da incidência e da severidade de cada doença foram submetidos a análise de variância e para comparação entre os tratamentos foi utilizado o teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Figura 1 - Esquema do experimento para o controle de mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) e queima da saia (*Rhizoctonia solani*) em mudas de alface



3.5 Controle de mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) e mela da soja (*Rhizoctonia solani*) em folhas de soja destacadas

A segunda etapa da pesquisa consistiu na aplicação dos probióticos BIO 21 líquido e BS líquido em folhas destacadas de soja para o controle de *S. sclerotiorum* e *R. solani*. Para isso, trifólios de plantas de soja foram coletados e acondicionados em placas de Petri de 15 cm de diâmetro, onde o trifólio foi destacado em três folíolos e o pecíolo de cada um foi envolvido por algodão embebido com água destilada, na base da placa foi disposto um disco de papel filtro embebido com água destilada, a placa foi envolvida com papel filme para a manutenção da umidade (Figura 2). Os probióticos foram aplicados na concentração de 1×10^7 UFC/ml e água destilada para as testemunhas, onde cada folíolos foi tratado com 0,73 ml do seu respectivo tratamento. Os produtos foram aplicados 24 horas antes da inoculação (Preventivo) e simultaneamente a inoculação do patógeno, totalizando seis tratamentos, dos quais: BIO 21 24 horas, BS 24 horas, BIO 21 simultâneo, BS simultâneo, testemunha inoculada e testemunha. A inoculação foi realizada com um disco de micélio de *S. sclerotiorum* e *R. solani* com 10 dias de idade sobre cada folíolos, que foram repicados

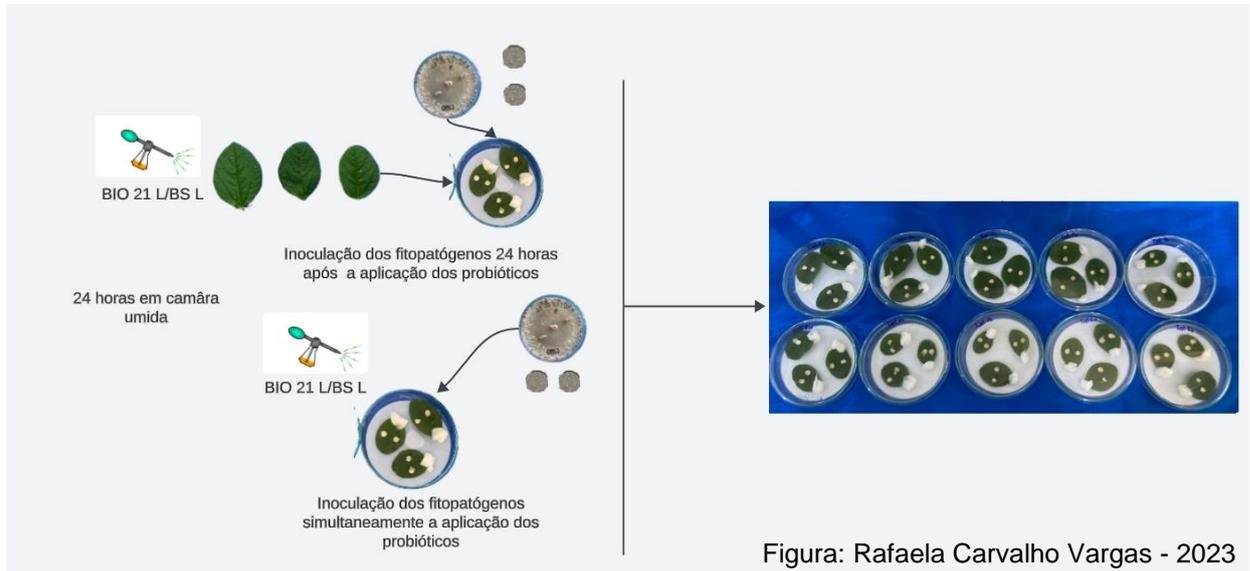
em meio BDA e mantidos em sala de crescimento a 20 ± 2 °C com fotoperíodo de 12 horas (Figura 3). Os discos foram colocados na parte superior do folíolo, com o crescimento micelial voltado para baixo em contato com o hospedeiro. Após a aplicação dos produtos as placas foram dispostas em sala de crescimento a 20 ± 2 °C com fotoperíodo de 12 horas. A avaliação da severidade foi realizada quatro dias após a inoculação dos patógenos, utilizando o pacote Pliman do software R® para quantificação das lesões. Para isso, foram tiradas fotos de cada repetição referentes aos seis tratamentos, para a obtenção da porcentagem de severidade. O ensaio foi arranjado em delineamento inteiramente casualizado, com seis tratamentos e 10 repetições.

Os dados da severidade de cada doença foram submetidos a análise de variância e para comparação entre os tratamentos foi utilizado o teste de Tukey a 5 % de probabilidade, utilizando o software Sisvar®.

Figura 2 - Placas de Petri plástica com 15 cm de diâmetro preparadas para o experimento com folhas destacadas.



Figura 3 - Esquema do experimento para o controle de mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) e queima da saia (*Rhizoctonia solani*) em folhas destacadas de soja



4 RESULTADOS

4.1 Avaliação do potencial dos probióticos na promoção de crescimento de alface.

4.1.1 Efeito dos probióticos aplicados no substrato de semeadura da cultura na promoção de crescimento

Após 30 dias a semeadura, nos três experimentos, a altura da planta, o volume do sistema radicular, as massas frescas e secas da parte aérea e do sistema radicular, de modo geral, aumentaram significativamente com a aplicação dos probióticos BIO 21 pó e BS pó, diferindo estatisticamente quando comparado à testemunha e aos tratamentos BIO 21 líquido e BS líquido (Tabela 3, Figura 4). O BIO 21 pó proporcionou maior incremento da massa fresca da parte aérea comparado aos demais tratamentos. A variável comprimento da raiz não apresentou diferença, exceto para o terceiro experimento em que apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) (Tabela 3, Figura 4).

De modo geral, foi observado de que os tratamentos BIO 21 pó e BS pó proporcionou um aumento médio de, aproximadamente, duas vezes nos valores das variáveis de desenvolvimento avaliadas em comparação aos tratamentos Bio 21 líquido, BS líquido e testemunha ($p\text{-valor} < 0,05$) (Tabela 3 e Figura 4).

Tabela 3 - Efeito dos probióticos Bio 21 pó, BS pó, BIO 21 L e BS L aplicados no substrato de semeadura no desenvolvimento de plantas de alface cultivar Vanda.

Experimento 1							
Tratamento	Altura (cm)	Comprimento da raiz (cm)	Volume do sistema radicular (ml)	Massa fresca da parte aérea (g)	Massa seca da parte aérea (g)	Massa fresca do sistema radicular (g)	Massa seca do sistema radicular (g)
Bio 21 pó	6,94 a	9,72 a	1,51 a	1,85 a	0,21 a	1,50 a	0,092 a
BS PÓ	4,98 b	8,45 a	1,28 a	1,17 b	0,14 b	1,24 a	0,075 a
Bio 21 L	3,69 b	9,50 a	0,57 b	0,58 c	0,077 c	0,58 b	0,047 b
BS L	3,48 b	8,77 a	0,49 b	0,52 c	0,070 c	0,51 b	0,040 b
Testemunha	3,58 b	9,44 a	0,55 b	0,53 c	0,070 c	0,59 b	0,042 b
CV(%)	15,16	15,98	21,91	10,6	14,19	14,86	16,16
Experimento 2							
Tratamento	Altura (cm)	Comprimento da raiz (cm)	Volume do sistema radicular (ml)	Massa fresca da parte aérea (g)	Massa seca da parte aérea (g)	Massa fresca do sistema radicular (g)	Massa seca do sistema radicular (g)
Bio 21 pó	7,54 b	9,85 a	0,62 a	1,06 a	0,062 b	0,61 a	0,025 a
BS PÓ	8,25 a	9,59 a	0,71 a	0,89 a	0,075 a	0,72 a	0,030 a
Bio 21 L	2,98 c	9,28 a	0,27 b	0,24 b	0,020 c	0,27 b	0,010 b
BS L	2,72 c	9,72 a	0,20 b	0,19 b	0,020 c	0,22 b	0,015 b
Testemunha	2,77 c	8,90 a	0,19 a	0,21 b	0,020 c	0,20 b	0,010 b
CV(%)	5,79	7,92	32,02	16,7	9,24	33,3	20,29
Experimento 3							
Tratamento	Altura (cm)	Comprimento da raiz (cm)	Volume do sistema radicular (ml)	Massa fresca da parte aérea (g)	Massa seca da parte aérea (g)	Massa fresca do sistema radicular (g)	Massa seca do sistema radicular (g)
Bio 21 pó	10,67 a	7,47 c	0,62 a	1,54 a	0,090 a	0,62 a	0,027 a
BS PÓ	10,14 a	7,94 bc	0,66 a	1,31 b	0,075 a	0,72 a	0,022 a
Bio 21 L	4,44 b	8,69 ab	0,30 b	0,27 c	0,027 b	0,30 b	0,012 b
BS L	4,18 b	8,97 a	0,25 b	0,23 c	0,022 b	0,25 b	0,012 b
Testemunha	4,07 b	8,53 ab	0,22 b	0,22 c	0,017 b	0,23 b	0,010 b
CV(%)	6,57	5,48	18,03	13,28	16,07	17,27	24,01

¹Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, 5 % de probabilidade.

²Bio 21 L e Bio 21 pó = probióticos em formulação líquida e pó contendo as cepas bacterianas *Enterococcus faecium* (LOFU 84, LOFU 124, LOFU 140, LOFU 145, LOFU 146, LOFU 158), *Lactobacillus acidophilus* (LOFU 63), *Lactobacillus delbrueckii* (LOFU 65), *Lactobacillus plantarum* (LOFU 79, LOFU 83, LOFU 147), *Lactobacillus reuteri* (LOFU 18, LOFU 21, LOFU 22, LOFU 35, LOFU 48), *Lactobacillus salivarius* (LOFU 44), *Pediococcus acidilactici* (LOFU 57, LOFU 58, LOFU 82) e *Bacillus subtilis* (LOFU 160); BS L e BS pó= probióticos em formulação líquida e pó contendo a cepa bacteriana *Bacillus subtilis* (LOFU 160).

Figura 4 - Mudanças de alface com trinta dias de idade, após a aplicação dos probióticos BIO 21 pó, BS pó, BIO 21 L e BS L via substrato de sementeira, para observar o efeito promotor no desenvolvimento de plantas de alface cultivar Vanda. (a) Experimento 1, (b) Experimento 2 e (c) experimento 3.



Figura: Rafaela Carvalho Vargas - 2023

¹Bio 21 L e Bio 21 pó = probióticos em formulação líquida e pó contendo as cepas bacterianas *Enterococcus faecium* (LOFU 84, LOFU 124, LOFU 140, LOFU 145, LOFU 146, LOFU 158), *Lactobacillus acidophilus* (LOFU 63), *Lactobacillus delbrueckii* (LOFU 65), *Lactobacillus plantarum* (LOFU 79, LOFU 83, LOFU 147), *Lactobacillus reuteri* (LOFU 18, LOFU 21, LOFU 22, LOFU 35, LOFU 48), *Lactobacillus salivarius* (LOFU 44), *Pediococcus acidilactici* (LOFU 57, LOFU 58, LOFU 82) e *Bacillus subtilis* (LOFU 160); BS L e BS pó= probióticos em formulação líquida e pó contendo a cepa bacteriana *Bacillus subtilis* (LOFU 160).

4.1.2 Efeito dos probióticos aplicados via drench em mudas de alface

4.1.2.1 Aplicação dos probióticos via drench nas mudas de alface

Quando os probióticos (Colostrum® BIO 21 Líquido, Colostrum® BIO 21 MIX, Colostrum® BS, Colostrum® BS Líquido) foram aplicados semanalmente, foi observado que aos 21 dias após emergência das plântulas, de modo geral, os probióticos BIO 21 pó e BS pó aumentaram significativamente o crescimento da alface, diferindo estatisticamente quando comparados à testemunha e aos tratamentos BIO 21 líquido e BS líquido ($p < 0,05$). (Tabela 4 e Figura 5).

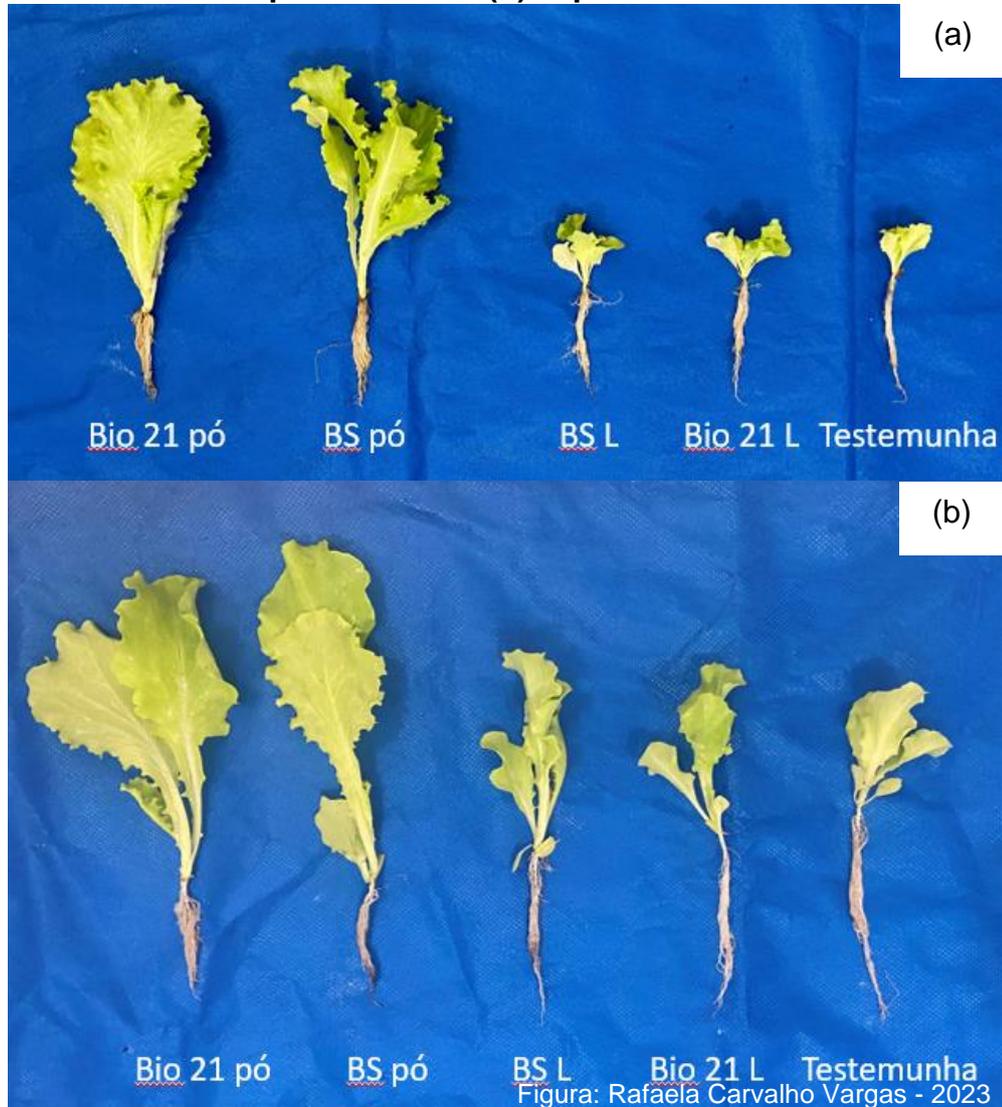
Tabela 4 - Efeito dos probióticos BIO 21 pó, BS pó, BIO 21 L e BS L, em aplicações semanais via drench, no desenvolvimento de plantas de alface cultivar Vanda. Experimentos 1 e 2.

Experimento 1							
Tratamento	Altura (cm)	Comprimento da raiz (cm)	Volume do sistema radicular (ml)	Massa fresca da parte aérea (g)	Massa seca da parte aérea (g)	Massa fresca do sistema radicular (g)	Massa seca do sistema radicular (g)
Bio 21 pó	13,77 a	6,54 c	0,42 ab	2,67 a	0,11 a	0,43 b	0,010 a
BS PÓ	14,20 a	8,84 ab	0,51 ab	2,66 a	0,10 a	0,49 ab	0,010 a
Bio 21 L	8,45 b	9,94 ab	0,54 a	1,07 b	0,098 a	0,58 a	0,012 a
BS L	6,87 bc	8,93 ab	0,41 b	0,75 b	0,055 a	0,41 b	0,010 a
Testemunha	5,97 c	10,21 a	0,46 ab	0,63 b	0,050 a	0,46 b	0,012 a
CV(%)	7,3	17,88	12,13	14,16	33,48	8,84	29,92
Experimento 2							
Tratamento	Altura (cm)	Comprimento da raiz (cm)	Volume do sistema radicular (ml)	Massa fresca da parte aérea (g)	Massa seca da parte aérea (g)	Massa fresca do sistema radicular (g)	Massa seca do sistema radicular (g)
Bio 21 pó	13,87 a	7,86 b	1,68 a	5,83 a	0,39 a	1,68 a	0,065 a
BS PÓ	13,54 a	8,34 ab	1,82 a	5,01 b	0,36 a	1,82 a	0,070 a
Bio 21 L	5,18 b	9,57 a	0,84 b	0,78 c	0,082 b	0,80 b	0,035 b
BS L	4,37 b	9,39 a	0,54 c	0,54 c	0,060 b	0,54 bc	0,025 b
Testemunha	3,98 b	8,74 ab	0,50 c	0,47 c	0,052 b	0,50 c	0,022 b
CV(%)	9,21	7,39	11,61	7,93	9,47	12,14	15,13

¹Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, 5 % de probabilidade.

²Bio 21 L e Bio 21 pó = probióticos em formulação líquida e pó contendo as cepas bacterianas *Enterococcus faecium* (LOFU 84, LOFU 124, LOFU 140, LOFU 145, LOFU 146, LOFU 158), *Lactobacillus acidophilus* (LOFU 63), *Lactobacillus delbrueckii* (LOFU 65), *Lactobacillus plantarum* (LOFU 79, LOFU 83, LOFU 147), *Lactobacillus reuteri* (LOFU 18, LOFU 21, LOFU 22, LOFU 35, LOFU 48), *Lactobacillus salivarius* (LOFU 44), *Pediococcus acidilactici* (LOFU 57, LOFU 58, LOFU 82) e *Bacillus subtilis* (LOFU 160); BS L e BS pó = probióticos em formulação líquida e pó contendo a cepa bacteriana *Bacillus subtilis* (LOFU 160).

Figura 5 - Mudanças de alface 21 dias após a aplicação semanal dos probióticos BIO 21 pó, BS pó, BIO 21 L e BS L via drench em substrato indicando o efeito na promoção do desenvolvimento de plantas de alface cultivar Vanda. (a) Experimento 1 e (b) experimento 2.



¹Bio 21 L e Bio 21 pó = probióticos em formulação líquida e pó contendo as cepas bacterianas *Enterococcus faecium* (LOFU 84, LOFU 124, LOFU 140, LOFU 145, LOFU 146, LOFU 158), *Lactobacillus acidophilus* (LOFU 63), *Lactobacillus delbrueckii* (LOFU 65), *Lactobacillus plantarum* (LOFU 79, LOFU 83, LOFU 147), *Lactobacillus reuteri* (LOFU 18, LOFU 21, LOFU 22, LOFU 35, LOFU 48), *Lactobacillus salivarius* (LOFU 44), *Pediococcus acidilactici* (LOFU 57, LOFU 58, LOFU 82) e *Bacillus subtilis* (LOFU 160); BS L e BS pó = probióticos em formulação líquida e pó contendo a cepa bacteriana *Bacillus subtilis* (LOFU 160).

4.1.2.1 Aplicação semanal dos probióticos BIO 21 Pó e BS Pó

Na análise do experimento com o probiótico BIO 21 pó, aplicado no substrato de produção de mudas de alface nas dosagens de 0, 7,5, 15, 22,5 e 30 g de BIO 21/L de água, foi observada uma resposta quadrática com ponto de inflexão na dosagem 15 g de BIO 21/L de água (Figura 6 e 7) para todas as variáveis analisadas. A maior produção de biomassa da alface para as variáveis altura da planta ($y = -0,9423x^2 + 7,4206x - 1,7732$), massa fresca e seca da parte aérea ($y = -0,1571x^2 + 1,4193x - 0,9751$ e $y = -0,0111x^2 + 0,0849x - 0,0445$) ocorreu na dosagem de 15 g de BIO 21/L de água (Figura 6 e 7). Enquanto que, para a produção de biomassa da raiz a dosagem de 7,5 g de BIO 21/L de água foi o suficiente para incrementar a massa fresca e seca ($y = -0,0523x^2 + 0,3363x + 0,012$ e $y = -0,0014x^2 + 0,0077x + 0,0047$) e o volume da raiz ($y = -0,0523x^2 + 0,3363x + 0,012$) (Figura 6 e 7).

No experimento com o probiótico BS pó também foi observada uma resposta quadrática com ponto de inflexão na dosagem 15 g de BS/L de água (Figura 8 e 9) para a maioria das variáveis analisadas. A maior produção de biomassa da cultura para as variáveis altura da planta ($y = -0,4342x^2 + 4,0042x + 0,3294$), massa fresca da parte aérea ($y = -0,0283x^2 + 0,5934x - 0,313$) ocorreu na dosagem de 22,5 g de BIO 21/L de água, sendo que, quando obtida a massa seca da parte aérea ($y = -0,0065x^2 + 0,0665x - 0,0267$) a dosagem de 15 g de BIO 21/L de água foi mais eficiente (Figura 8 e 9). O acúmulo de biomassa na raiz foi mais eficiente a dosagem de 30 g de BIO 21/L de água nas variáveis massa fresca ($y = -0,0243x^2 + 0,3117x - 0,0021$) e o volume da raiz ($y = -0,0243x^2 + 0,3117x - 0,0021$), no entanto, quando obtida a massa seca da raiz ($y = -0,0048x^2 + 0,0337x - 0,0182$) a dosagem de 15 g de BIO 21/L de água foi mais eficiente (Figura 8 e 9).

Em ambos experimentos, obteve-se uma correlação forte entre as dosagens aplicadas dos probióticos e o incremento de biomassa na cultura da alface, com valores de coeficiente de correlação próximo a 1 para a maioria das variáveis. À medida que se aumentava a dosagem dos probióticos foi obtido maior eficiência no acúmulo de biomassa, no entanto, para o probiótico BIO 21 PÓ nas altas dosagens (22,5 e 30 g/L) houve redução na produção de biomassa vegetal.

Figura 6 - Efeito do probiótico BIO 21 pó aplicado semanalmente em mudas no desenvolvimento das variáveis altura, comprimento e volume da raiz em plantas de alface cultivar Vanda.

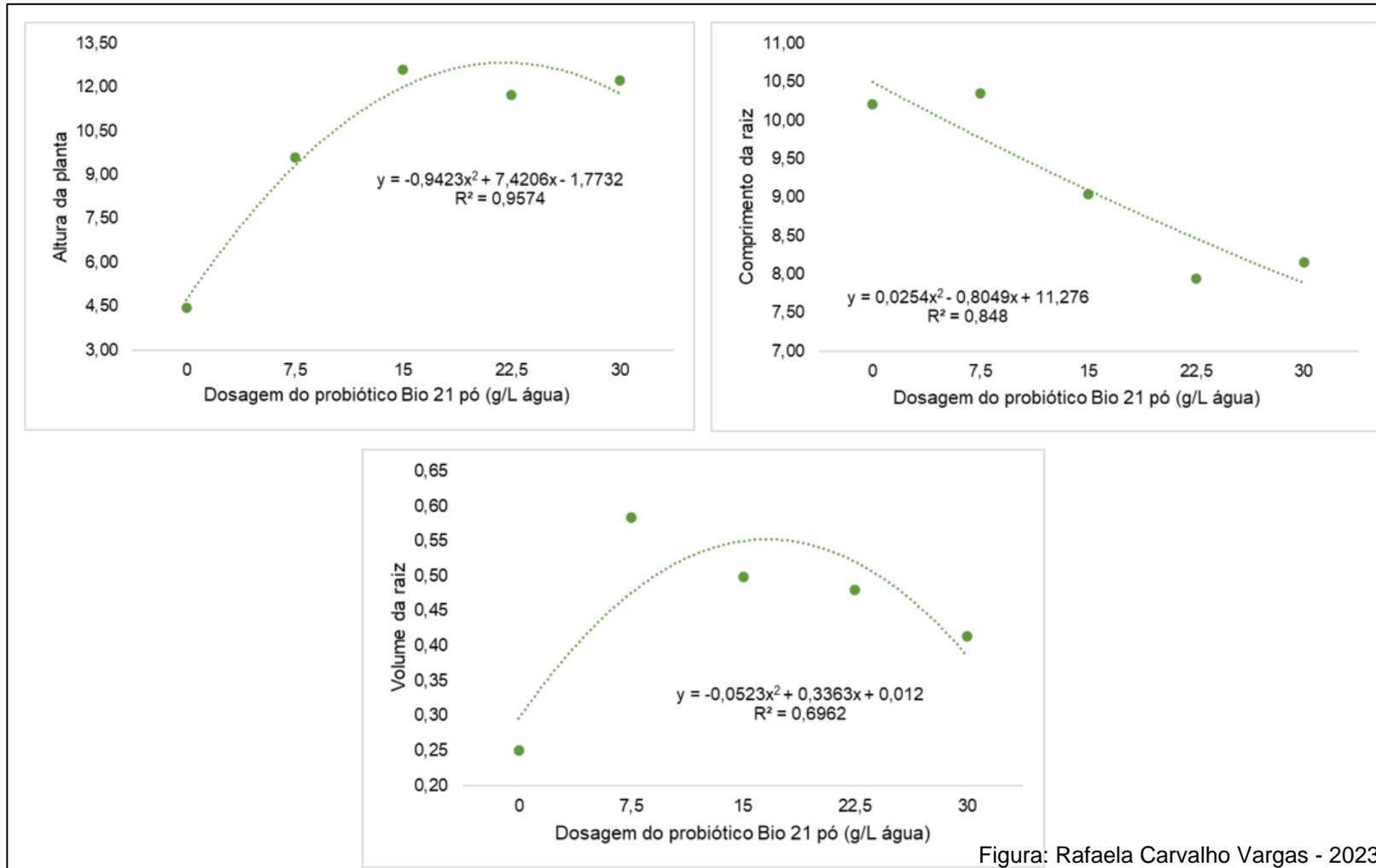


Figura 7 - Efeito do probiótico BIO 21 pó aplicado semanalmente mudas no desenvolvimento das variáveis massa fresca e seca da parte aérea e da raiz em plantas de alface cultivar Vanda.

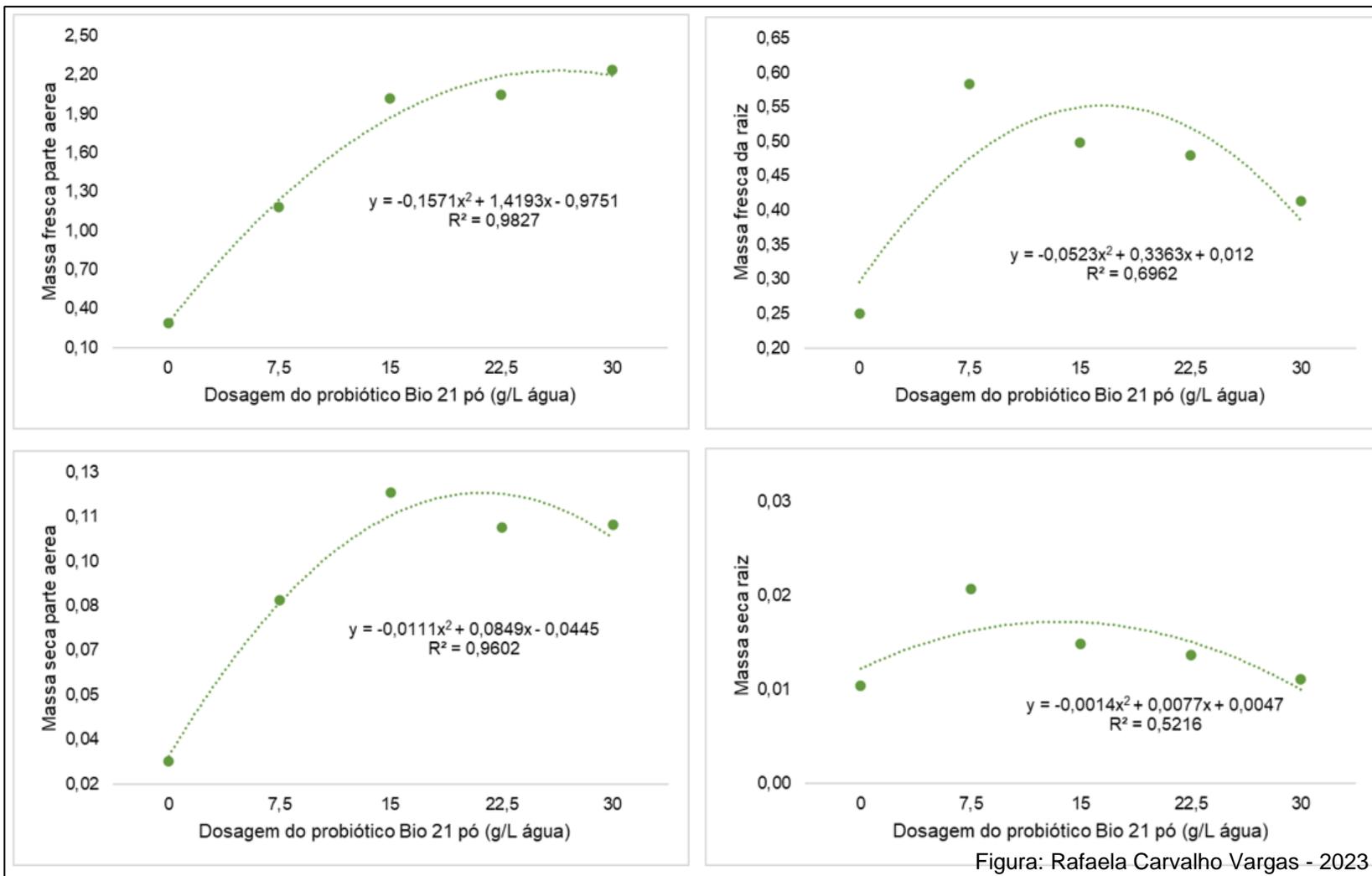


Figura 8 - Efeito do probiótico BS pó aplicado semanalmente em mudas no desenvolvimento das variáveis altura, comprimento e volume da raiz em plantas de alface cultivar Vanda.

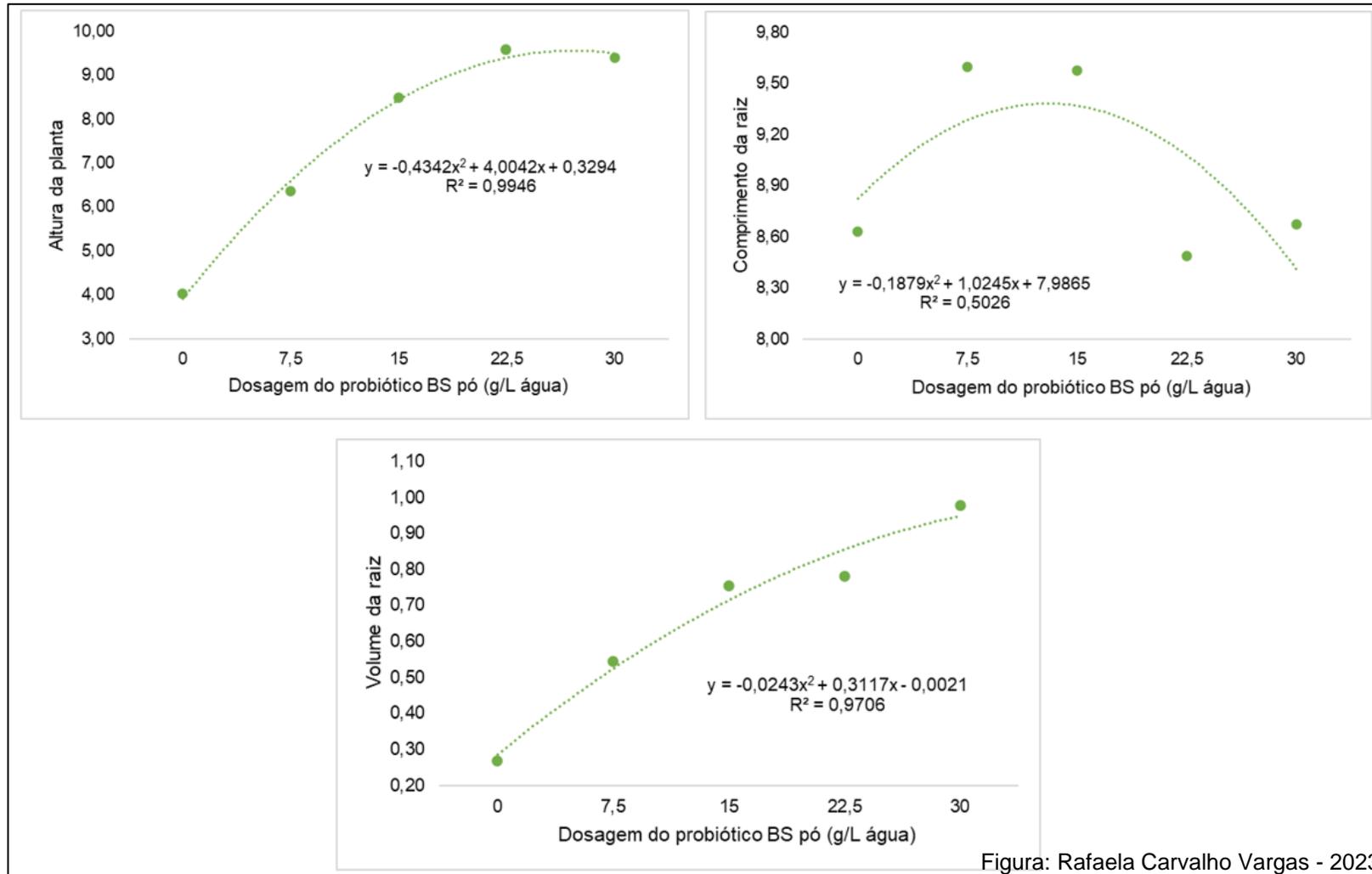


Figura: Rafaela Carvalho Vargas - 2023

Figura 9 - Efeito do probiótico BS pó aplicado semanalmente mudas no desenvolvimento das variáveis massa fresca e seca da parte aérea e da raiz em plantas de alface cultivar Vanda.

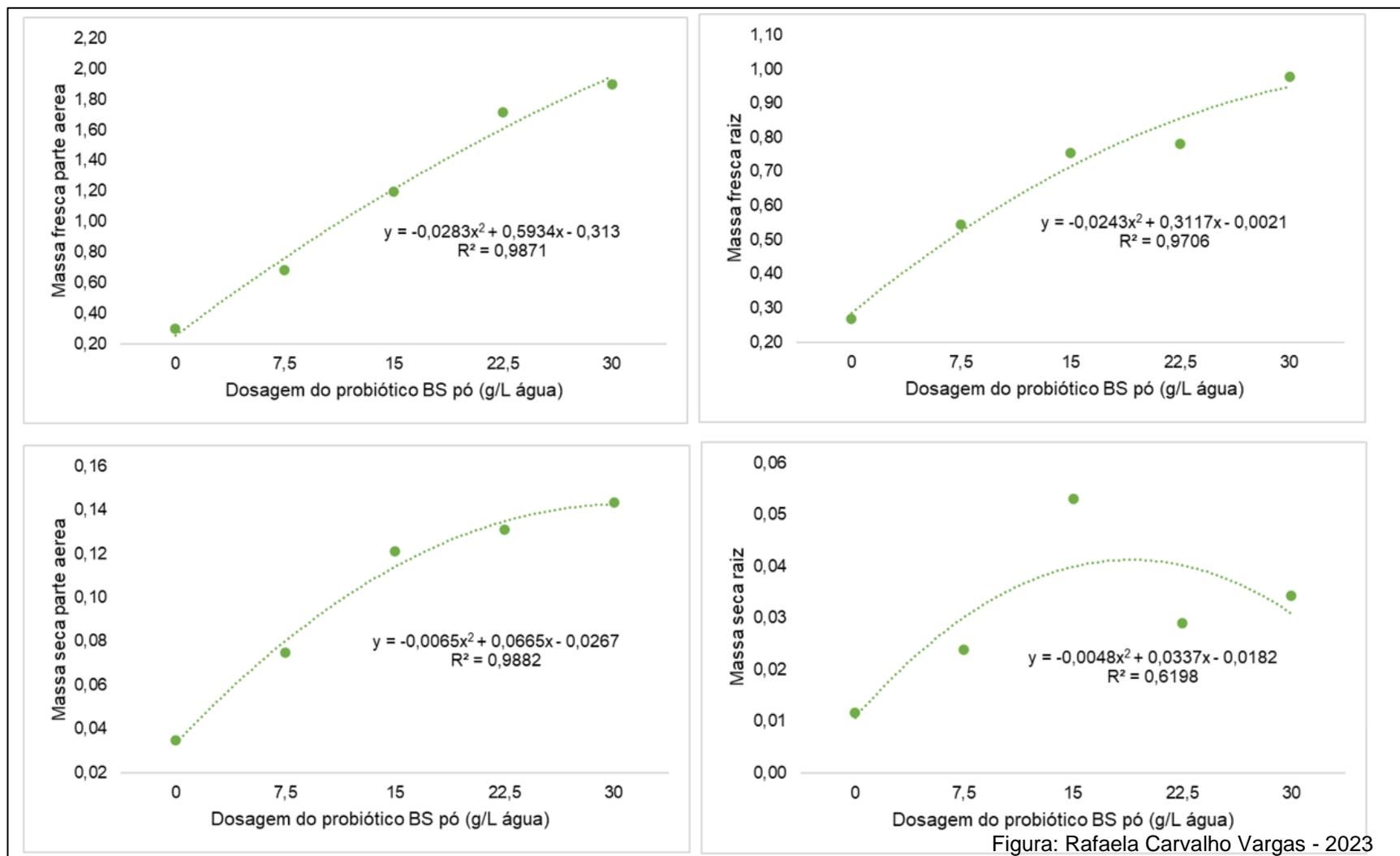


Figura 10 - Mudas de alface aos 30 dias de idade após a aplicação semanal, via drench em substrato, dos probióticos BIO 21 pó, BS pó, nas dosagens 0, 7,5, 15, 22, 5 e 30 g/L para avaliar o efeito no desenvolvimento de plantas de alface cultivar Vanda. (a) Experimento BIO 21 pó e (b) Experimento BS pó.

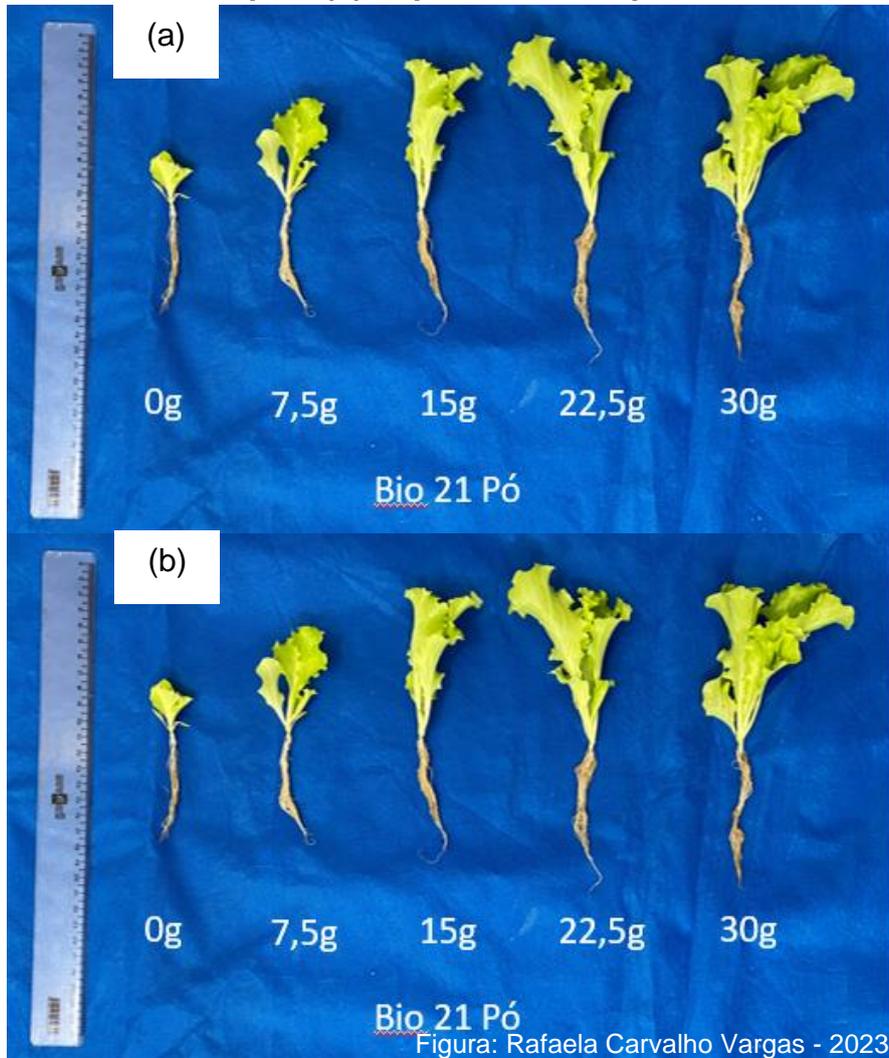


Figura: Rafaela Carvalho Vargas - 2023

¹Bio 21 pó em dosagens 0, 7,5, 15, 22,5 e 30 g/L de água = probiótico em formulação pó contendo as cepas bacterianas *Enterococcus faecium* (LOFU 84, LOFU 124, LOFU 140, LOFU 145, LOFU 146, LOFU 158), *Lactobacillus acidophilus* (LOFU 63), *Lactobacillus delbrueckii* (LOFU 65), *Lactobacillus plantarum* (LOFU 79, LOFU 83, LOFU 147), *Lactobacillus reuteri* (LOFU 18, LOFU 21, LOFU 22, LOFU 35, LOFU 48), *Lactobacillus salivarius* (LOFU 44), *Pediococcus acidilactici* (LOFU 57, LOFU 58, LOFU 82) e *Bacillus subtilis* (LOFU 160); BS pó em dosagens 0, 7,5, 15, 22,5 e 30 g/L de água= probiótico em formulação pó contendo a cepa bacteriana *Bacillus subtilis* (LOFU 160).

4.1.3 Experimentos de promoção de crescimento em vasos com aplicações no transplântio das mudas e via drench

Na análise do experimento com o probiótico BIO 21 pó, aplicado em mudas de alface transplantadas nas dosagens de 0, 7,5, 15, 22,5 e 30 g de BIO 21/L de água, foi observada uma resposta quadrática com ponto de inflexão na dosagem 15 g de BIO 21/L de água (Figura 11 e 12). Em mudas de alface transplantadas, as dosagens 22,5 e 30 g/L proporcionou maior incremento da altura da planta ($y = -0,0536x^2 + 1,0131x + 7,0583$), volume da raiz ($y = -0,0826x^2 + 1,058x + 2,1847$), massa fresca e seca da parte aérea ($y = 0,0893x^2 + 1,0778x + 2,193$ e $y = 0,0093x^2 + 0,1123x + 0,2975$) e massa fresca e seca da raiz ($y = -0,0826x^2 + 1,058x + 2,1847$ e $y = -0,0029x^2 + 0,0526x + 0,1293$). Sendo que, para a variável altura da planta a dosagem 15 g/L também apresentou eficiência em promover crescimento da alface (Figura 11 e 12).

No experimento com o probiótico BS pó também foi observada uma resposta quadrática com ponto de inflexão na dosagem 15 g de BS/L de água (Figura 13 e 14). Assim como observado no experimento anterior, as maiores dosagens do probiótico BS pó (22,5 e 30 g/L) apresentaram maior eficiência em promover crescimento da alface, devido aos maiores resultados no incremento de altura da planta ($y = -0,078x^2 + 1,492x + 5,83$), volume da raiz ($y = 0,0937x^2 + 0,6738x + 1,9567$), massa fresca e seca da parte aérea ($y = 0,28x^2 + 0,4227x + 2,4272$ e $y = 0,0223x^2 + 0,077x + 0,2918$) e massa fresca e seca da raiz ($y = 0,0937x^2 + 0,6738x + 1,9567$ e $y = -0,0048x^2 + 0,0817x + 0,0995$).

Em ambos experimentos, obteve-se uma correlação forte entre as dosagens dos probióticos e o incremento de biomassa na cultura da alface, com valores de coeficiente de correlação próximo a 1 para a maioria das variáveis. À medida que se aumentava a dosagem dos probióticos foi obtida maior eficiência no acúmulo de biomassa.

Figura 11 - Efeito do probiótico BIO 21 pó aplicado via drench em mudas transplantadas no desenvolvimento das variáveis altura, comprimento e volume da raiz em plantas de alface cultivar Vanda.

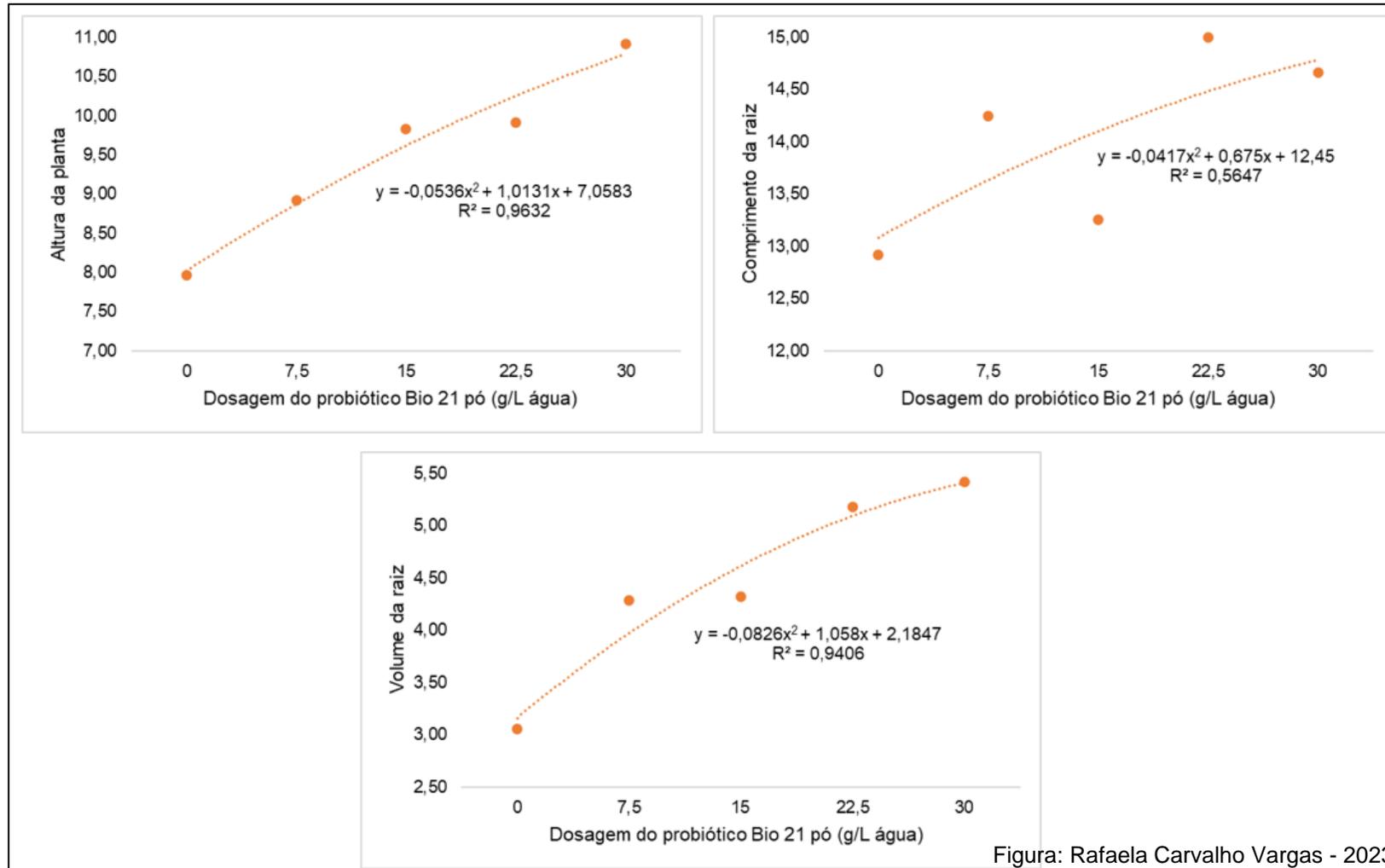


Figura 12 - Efeito do probiótico BIO 21 pó aplicado via drench em mudas transplantadas no desenvolvimento das variáveis massa fresca e seca da parte aérea e da raiz em plantas de alface cultivar Vanda.

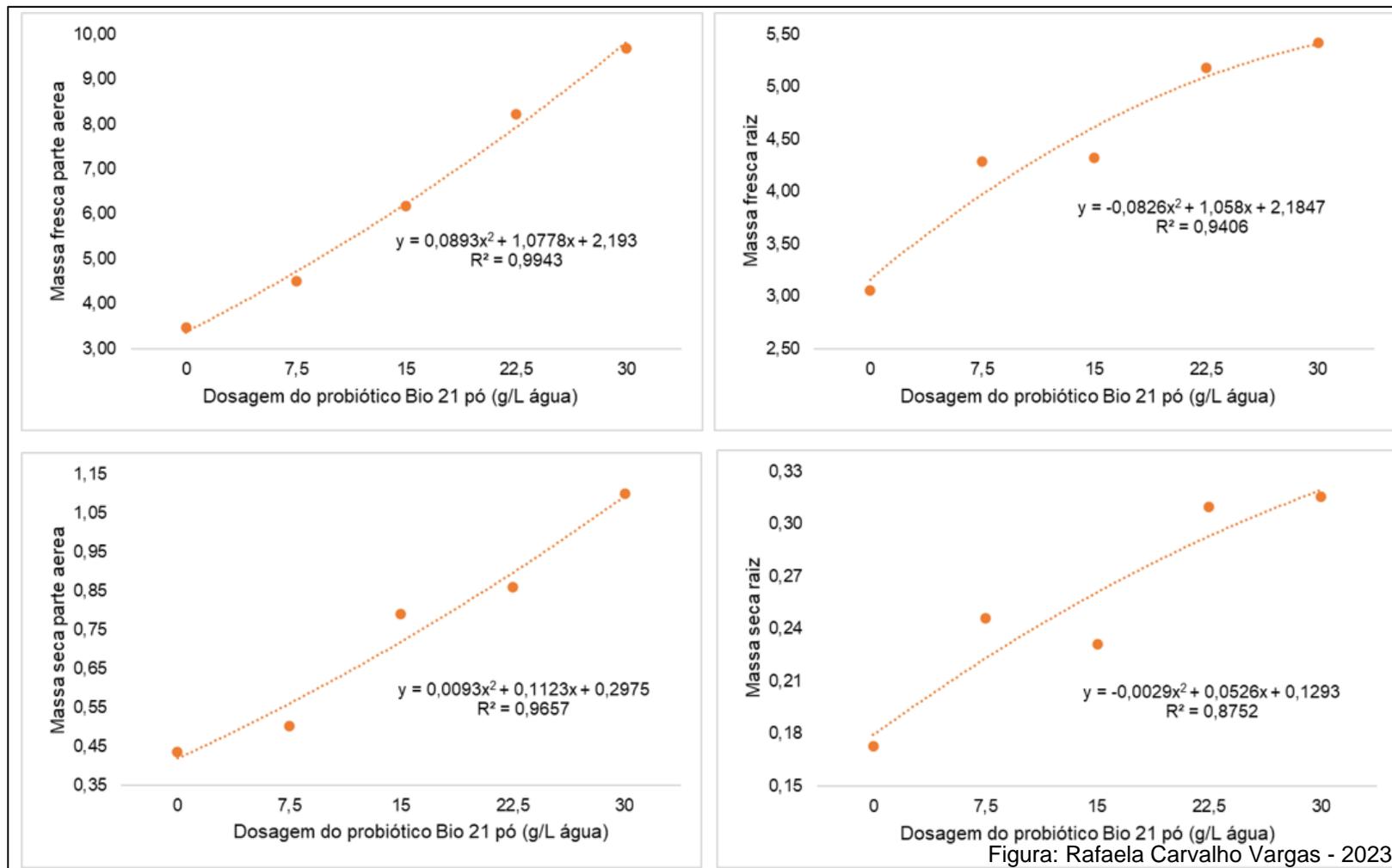


Figura 13 - Efeito do probiótico BS pó aplicado via drench em mudas transplantadas no desenvolvimento das variáveis altura, comprimento e volume da raiz em plantas de alface cultivar Vanda.

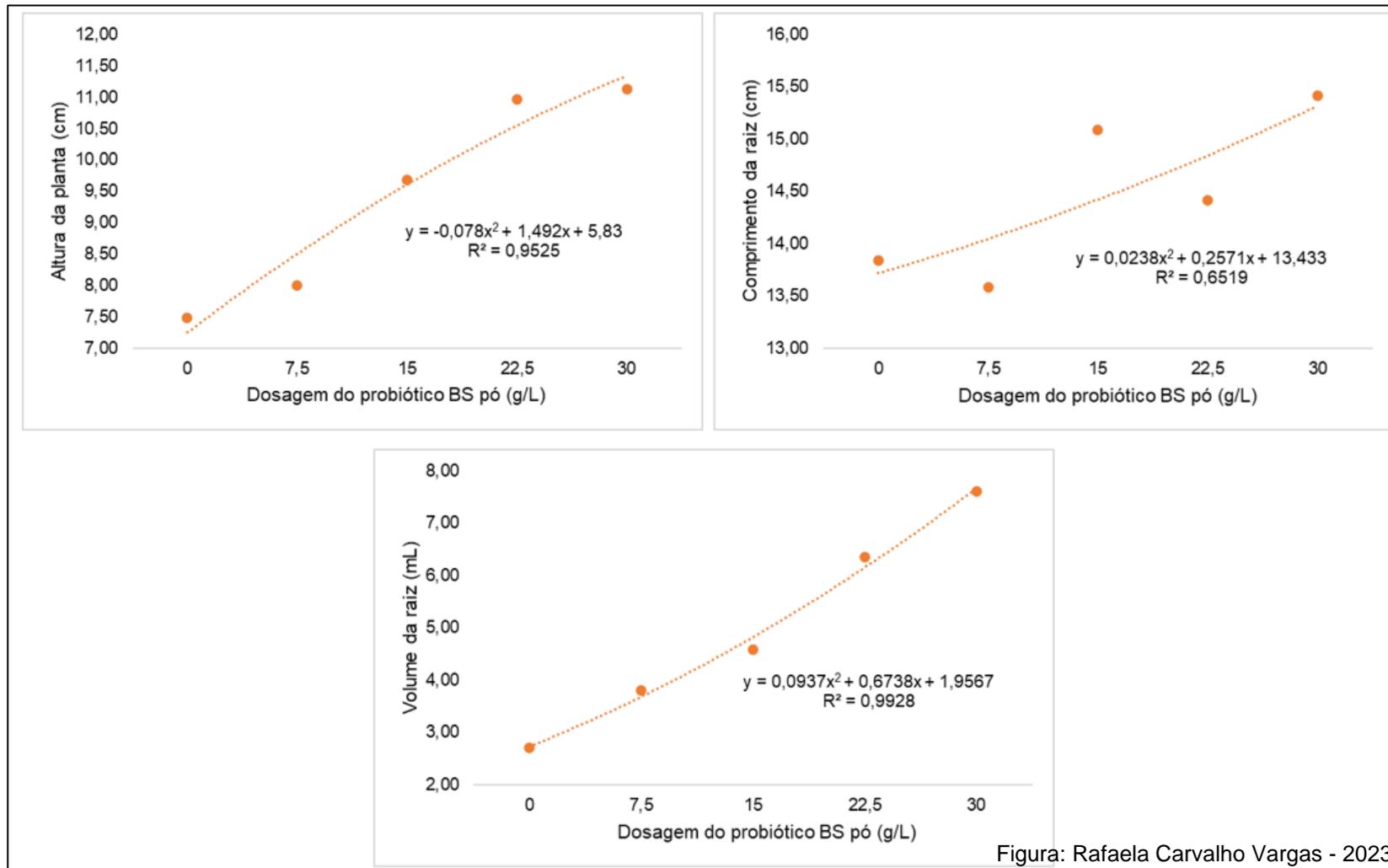


Figura 14 - Efeito do probiótico BS aplicado via drench em mudas transplantadas no desenvolvimento das variáveis massa fresca e seca da parte aérea e da raiz em plantas de alface cultivar Vanda.

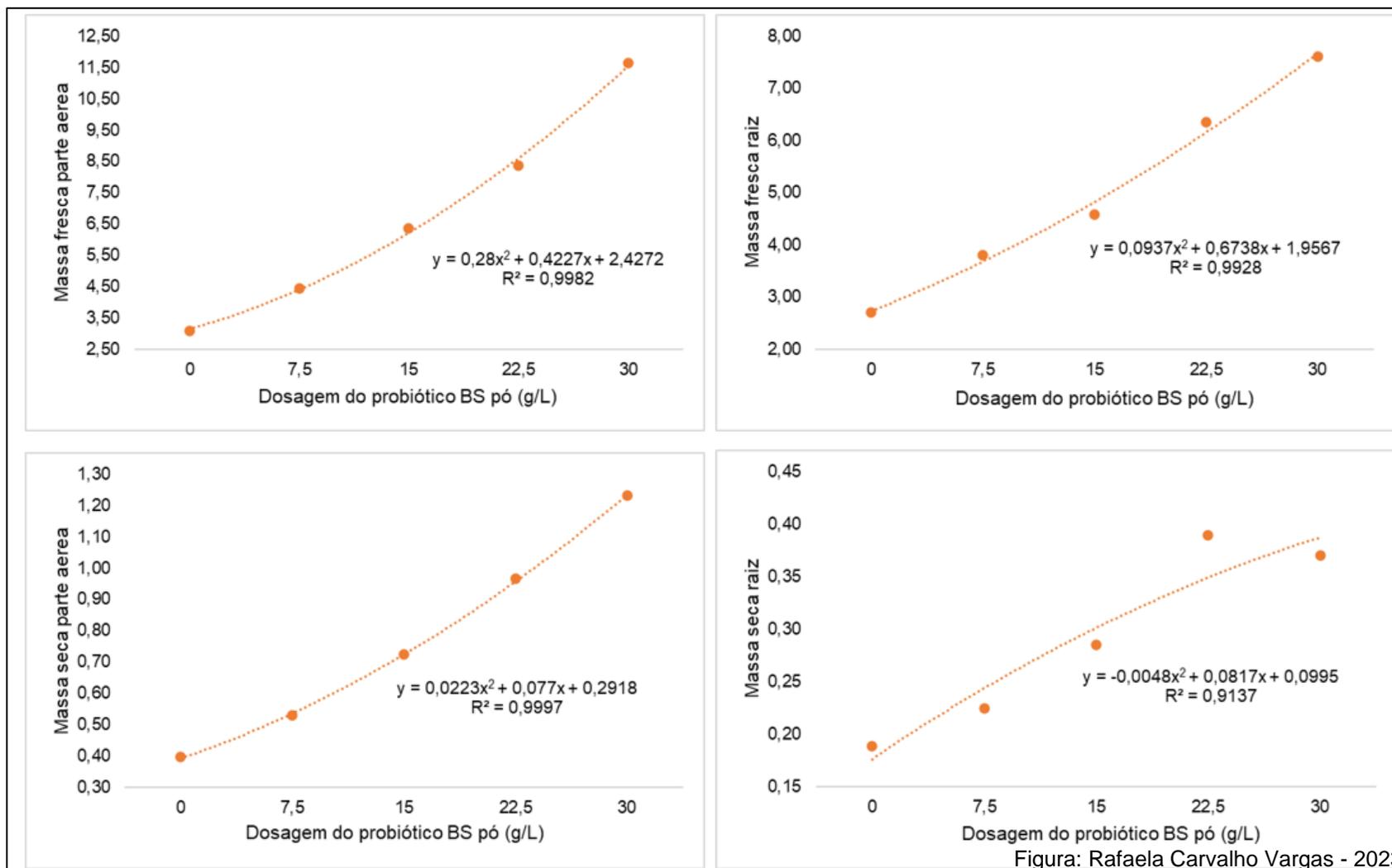


Figura 15 - Mudanças de alface aos 30 dias após o transplante e aplicação semanal via drench dos probióticos BIO 21 pó, BS pó, para avaliar o desenvolvimento de plantas de alface cultivar Vanda. (a) Experimento BIO 21 pó e (b) Experimento BS pó.



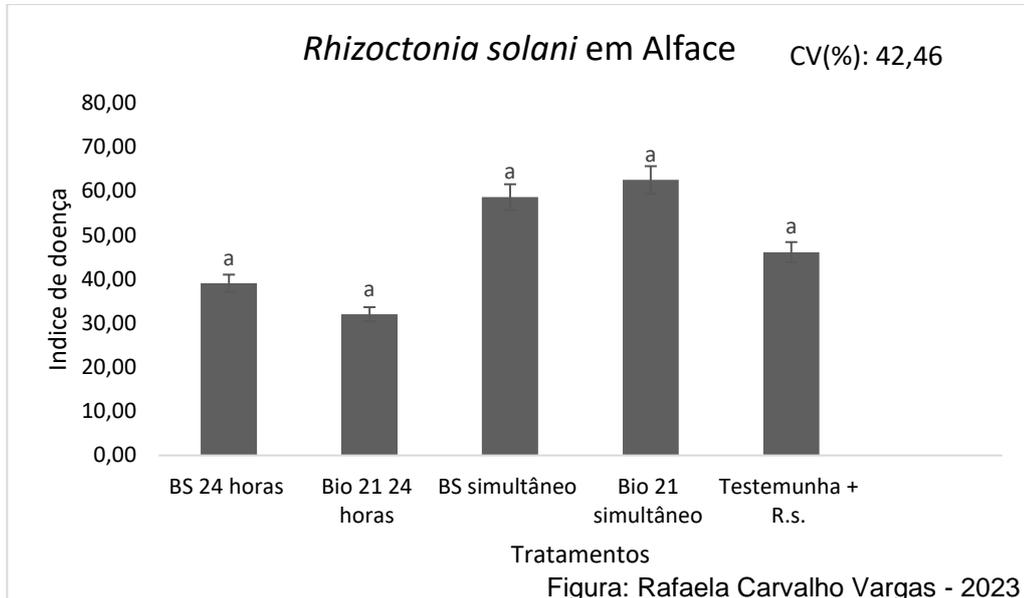
¹Bio 21 pó em dosagens 0, 7,5, 15, 22,5 e 30 g/L de água = probiótico em formulação pó contendo as cepas bacterianas *Enterococcus faecium* (LOFU 84, LOFU 124, LOFU 140, LOFU 145, LOFU 146, LOFU 158), *Lactobacillus acidophilus* (LOFU 63), *Lactobacillus delbrueckii* (LOFU 65), *Lactobacillus plantarum* (LOFU 79, LOFU 83, LOFU 147), *Lactobacillus reuteri* (LOFU 18, LOFU 21, LOFU 22, LOFU 35, LOFU 48), *Lactobacillus salivarius* (LOFU 44), *Pediococcus acidilactici* (LOFU 57, LOFU 58, LOFU 82) e *Bacillus subtilis* (LOFU 160); BS pó em dosagens 0, 7,5, 15, 22,5 e 30 g/L de água = probiótico em formulação pó contendo a cepa bacteriana *Bacillus subtilis* (LOFU 160).

4.2 Controle de mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) e Queima da saia (*Rhizoctonia solani*) em mudas de alface

Os probióticos Bio 21 líquido e BS líquido não reduziram o índice de queimada-saia na cultura da alface, causada por *Rhizoctonia solani* quando comparados com a testemunha inoculada ($p < 0,05$), tanto quando foram aplicados 24 horas antes ou simultaneamente à inoculação do patógeno (Figuras 8). No primeiro ensaio, nos tratamentos em que a aplicação foi simultânea foi observado aumento do índice da doença em relação a testemunha inoculada (Figuras 16). Os valores do índice da doença foram de 32,03; 39,06; 46,09; 58,59 e 62,50 para os Bio 21 24 h antes da inoculação do patógeno, BS 24 h antes da inoculação do patógeno, testemunha inoculada, Bs simultâneo à inoculação do patógeno e Bio 21 simultâneo à inoculação do patógeno, respectivamente (Figura 16). No entanto, no segundo ensaio, o tratamento com probiótico Bio 21 aplicado 24 horas antes a inoculação do patógeno reduziu o índice de doença em comparação a testemunha inoculada, enquanto que, os demais tratamentos com probióticos apresentarem resultado semelhante a testemunha (Figura 17). Os valores do índice de doença foram de 30,73; 38,28; 43,23; 54,43 e 58,85 para os tratamentos Bio 21 24 h, BS 24 h, Bio 21 simultâneo, Bs simultâneo e testemunha inoculada, respectivamente (Figura 17).

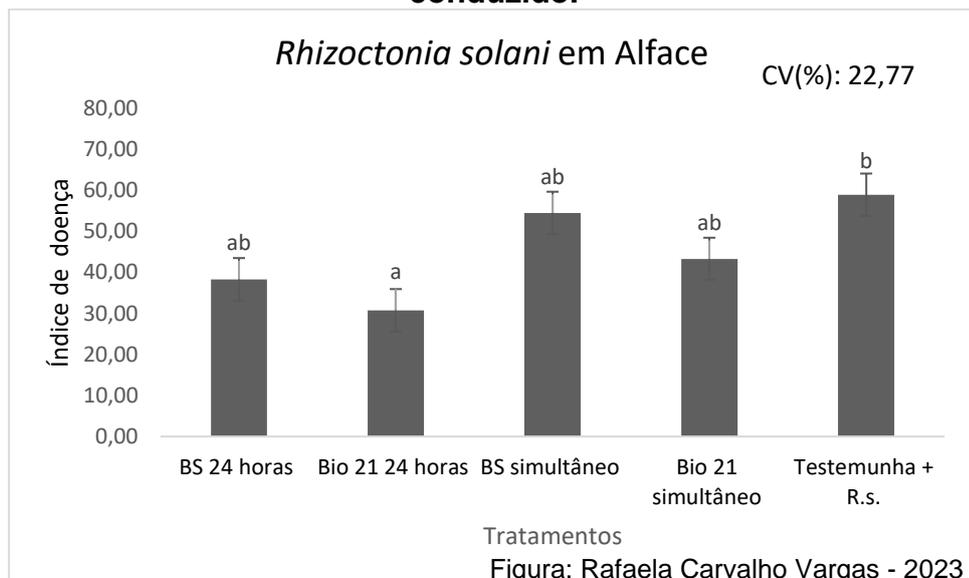
No experimento com *Sclerotinia sclerotiorum*, os probióticos Bio 21 líquido e BS líquido, aplicados em mudas de alface inoculadas com o patógeno não reduziram a incidência de mofo branco na cultura, quando comparados com a testemunha inoculada ($p < 0,05$) (Figura 18). Os valores de incidência foram de 87,5; 93,75; 93,75; 96,87 e 100 para os BS 24 h antes da inoculação do patógeno, Bio 21 24 h antes da inoculação do patógeno, Bs simultâneo à inoculação do patógeno, Bio 21 simultâneo à inoculação do patógeno e testemunha inoculada, respectivamente (Figura 18).

Figura 16 - Efeito dos probióticos BIO 21 líquido e BS líquido no controle da severidade da queima-da-saia (*Rhizoctonia solani*) da alface, da primeira vez em que o experimento foi conduzido.



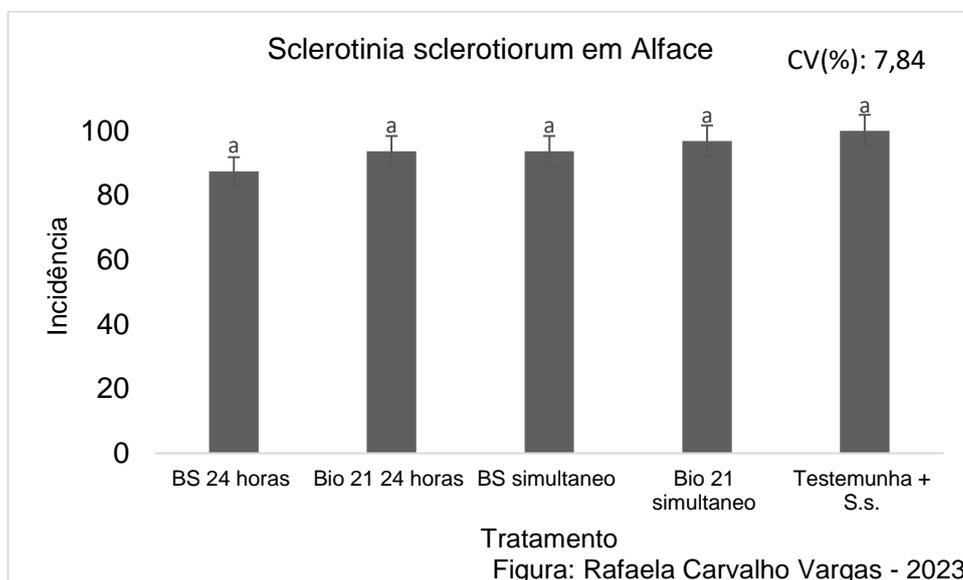
¹Bio 21 e BS 24 horas: aplicação dos probióticos 24 h antes à inoculação do patógeno; Bio 21 e BS 24 simultâneo: aplicação dos probióticos simultaneamente à inoculação do patógeno; Testemunha R.s.: testemunha inoculada com *Rhizoctonia solani*.

Figura 17 - Efeito dos probióticos BIO 21 líquido e BS líquido no controle da severidade da queima-da-saia (*Rhizoctonia solani*) da alface, da segunda vez em que o experimento foi conduzido.



¹Bio 21 e BS 24 horas: aplicação dos probióticos 24 h antes à inoculação do patógeno; Bio 21 e BS 24 simultâneo: aplicação dos probióticos simultaneamente à inoculação do patógeno; Testemunha R.s.: testemunha inoculada com *Rhizoctonia solani*.

Figura 18 - Efeito dos probióticos BIO 21 líquido e BS líquido no controle da incidência de mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) da alface.



¹Bio 21 e BS 24 horas: aplicação dos probióticos 24 h antes à inoculação do patógeno; Bio 21 e BS 24 simultâneo: aplicação dos probióticos simultaneamente à inoculação do patógeno; Testemunha R.s.: testemunha inoculada com *Sclerotinia sclerotiorum*.

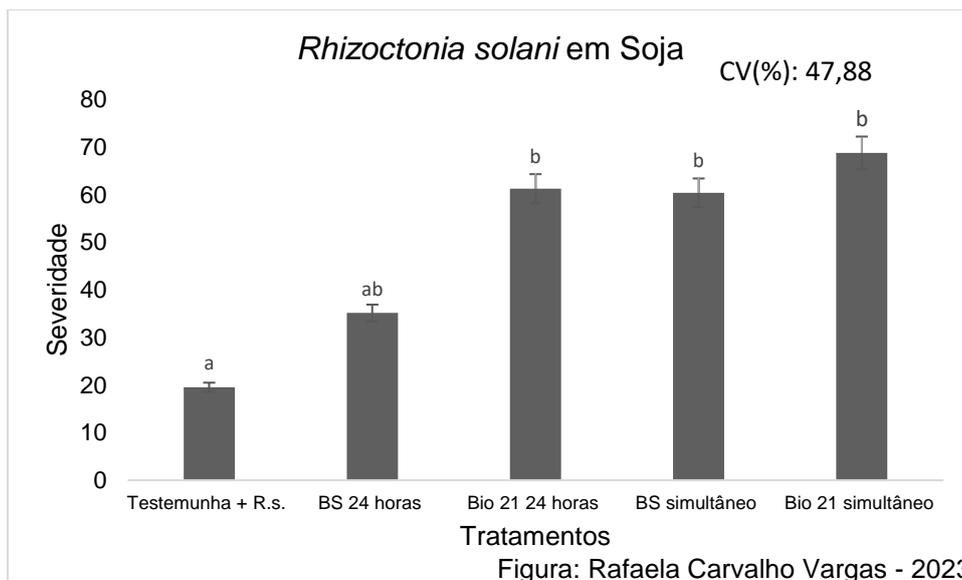
4.2 Controle de mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) e Mela da soja (*Rhizoctonia solani*) em folhas de soja destacadas

No experimento com folhas destacadas para o controle de *Rhizoctonia solani*, os resultados indicaram que o probióticos BIO 21 líquido e BS líquido não foram eficientes em reduzir a mela da soja. Ambos probióticos, tanto no tratamento aplicado 24 h antes a inoculação do patógenos como no aplicado simultaneamente, não diferiram da testemunha ($p < 0,05$) (Figura 19). No entanto, quando comparados os valores médios, observa-se que a aplicação dos probiótico BIO 21 líquido e BS líquido aumentaram a severidade na doença em comparação à testemunha. Os valores da severidade foram de: 19,5; 35,1; 61,2; 60,4 e 68,7% para os tratamentos Testemunha inoculada, BS líquido 24 horas antes da inoculação do patógeno, BIO 21 líquido 24 h antes da inoculação do patógeno, BS líquido simultâneo à inoculação do patógeno e BIO 21 líquido simultâneo à inoculação do patógeno, respectivamente (Figura 19).

No experimento para o controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, o tratamento BS 24 h antes da inoculação do patógeno reduziu a severidade em relação aos demais

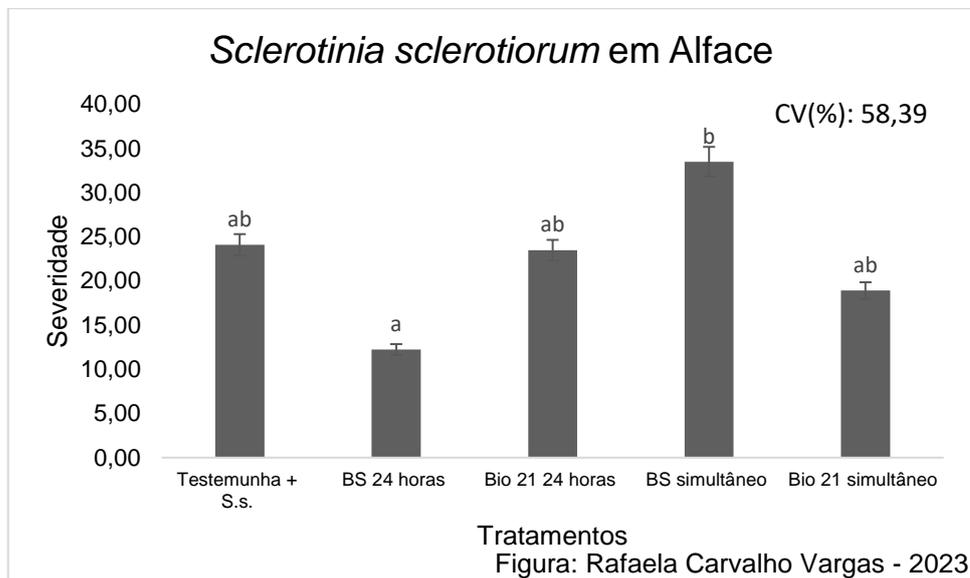
tratamentos, no entanto, não diferiu estatisticamente da severidade dos tratamentos BIO 21 24 h, BIO 21 simultâneo à inoculação do patógeno e testemunha inoculada ($p < 0,05$) (Figura 20). O tratamento BS simultâneo à inoculação do patógeno foi o que apresentou a maior severidade, favorecendo o aumento da severidade de mofo branco em relação a testemunha inoculada. Os valores da severidade foram de: 24,10; 12,24; 23,48; 33,51 e 18,91% para os tratamentos Testemunha inoculada, BS líquido 24 h antes da inoculação do patógeno, BIO 21 líquido 24 h antes da inoculação do patógeno, BS líquido simultâneo à inoculação do patógeno e BIO 21 líquido simultâneo à inoculação do patógeno, respectivamente (Figura 20).

Figura 19 - Efeito dos probióticos BIO 21 líquido e BS líquido no controle da severidade da mela da soja (*Rhizoctonia solani*) na cultura da soja.



¹Bio 21 e BS 24 horas: aplicação dos probióticos 24 h antes à inoculação do patógeno; Bio 21 e BS 24 simultâneo: aplicação dos probióticos simultaneamente à inoculação do patógeno; Testemunha R.s.: testemunha inoculada com *Rhizoctonia solani*

Figura 20 - Efeito dos probióticos BIO 21 líquido e BS líquido no controle da incidência do mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) na cultura da soja.



¹Bio 21 e BS 24 horas: aplicação dos probióticos 24 h antes à inoculação do patógeno; Bio 21 e BS 24 simultâneo: aplicação dos probióticos simultaneamente à inoculação do patógeno; Testemunha R.s.: testemunha inoculada com *Sclerotinia sclerotiorum*

5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstraram que os probióticos BIO 21 pó e BS pó promoveram o crescimento das plantas de alface, com aumento significativo na altura, massas frescas e secas da parte aérea e do sistema radicular e volume e comprimento do sistema radicular. Os métodos de aplicação dos probióticos, sua mistura com o substrato durante a semeadura ou por aplicação via drench realizada semanalmente em substrato de produção de mudas e em mudas transplantadas, foram eficientes em aumentar o desenvolvimento das plantas pelo aumento da biomassa radicular e da parte aérea. Nos experimentos, observou-se efeito persistente dos probióticos no desenvolvimento da alface ao longo do ciclo das mudas, mesmo em situações que foram feita uma única aplicação do probiótico.

Outro aspecto importante a ser considerado é que, mesmo em dosagens reduzidas (7,5 e 15 g de probióticos/L de água), os produtos BIO 21 pó e BS pó foram eficientes na promoção de crescimento da alface, apresentando efeitos benéficos tanto em mudas produzidas em bandejas como em plantas de alface transplantada para vasos. Nos experimentos com BS pó e BIO 21 em plantas de alface transplantadas é evidente o efeito crescente no desenvolvimento das plantas conforme se aumenta a concentração do probiótico. No entanto, a aplicação do probiótico BIO 21 PÓ em mudas produzidas em bandejas nas dosagens mais altas (22,5 e 30 g/L) apresentou redução na produção de biomassa vegetal, sendo um fator crucial para a determinação da dosagem quanto a fase fenológica da cultura em busca da otimização e uso racional do bioproduto.

Shao *et al.* (2023) relataram que a aplicação de *Bacillus amyloliquefaciens* foi eficiente em aumentar o diâmetro da cabeça, altura da planta e massa fresca da alface cultivar Green Moon. A aplicação de *Pseudomonas azotoformans*, *Bacillus velezensis* e *B. amyloliquefaciens* foram eficientes em aumentar a massa fresca e seca da alface cultivar Liston. No estudo, foram consideradas uma única aplicação das bactérias durante a fase viveiro, uma aplicação na fase de transplante e com aplicações em diferentes estágios de desenvolvimento da cultura. Em todas as formas de aplicação apresentou aumento no desenvolvimento das plantas de alface, corroborando com os resultados encontrados no presente estudo, inclusive que, o uso dessas bactérias permite o transplante de mudas mais precoce e colheitas mais precoce.

As bactérias *B. velezensis* e *B. subtilis* também já foram relatadas promovendo crescimento da alface com aumento de biomassa da parte aérea e radicular de diferentes cultivares, sendo que, *B. velezensis* promoveu esse efeito em alface cultivada em condições de estresse salino (Bai *et al.*, 2023; Sarti *et al.*, 2023). Em relação as bactérias do ácido láctico, algumas espécies de *Lactobacillus* já foram relatadas com potencial de promoção do crescimento de plantas, como no caso de *L. plantarum* que proporcionou maior incremento no comprimento da parte aérea e da raiz e maior presença de pelos radiculares em mudas de tomates (Limanska *et al.*, 2013). *Lactobacillus plantarum* e *Saccharomyces cerevisiae* também promoveram crescimento de mudas de pepino, com aumento na produção da biomassa da parte aérea e radicular (Kang *et al.*, 2015).

Dados os resultados já relatados na literatura e no presente estudo, o benefício exposto por esses microrganismos quanto promoção do crescimento da alface, indicam que os probióticos podem contribuir para o desenvolvimento de uma agricultura mais sustentável. No que diz respeito, a utilização das bactérias promotoras do crescimento como alternativa viável e segura para a redução do uso de fertilizantes químicos (Pathania *et al.*, 2020).

A promoção de crescimento por microrganismos, pode ocorrer de duas formas: diretamente associada à sua capacidade de produzir substâncias essenciais ao desenvolvimento da planta, como o Ácido indolacético (AIA), pela solubilização de fosfato ou indiretamente, pelo efeito antagônico a fitopatógenos (Dalal; Kulkarni, 2014; Mishra *et al.*, 2016). Em relação ao efeito de probióticos na promoção de crescimento de plantas, Freitas (2024) observou que os probióticos BIO 21 pó e BS pó promoveram o crescimento de mudas de café. Assim, os resultados dos estudos da presente dissertação corroboram com os resultados por Freitas (2024).

Deste modo, com os resultados expressivo do aumento da biomassa vegetal pode-se considerar que os microrganismos probióticos atuam de forma semelhante às rizobactérias promotoras de crescimento (PGPR) e promovem o crescimento vegetal. Os microrganismos que se enquadram nesse grupo têm a capacidade de proporcionar o desenvolvimento de ramificações e pelos radiculares, o que possibilita maior superfície de absorção de nutrientes e água pela planta (Idris *et al.*, 2007). É possível que o aumento no desenvolvimento dessas variáveis se deva pela presença de AIA, que em determinadas concentrações estimula o desenvolvimento de raízes secundárias e adventícias, o que resulta em um maior peso fresco e seco do sistema

radicular, e conseqüentemente do seu volume (Taiz; Zeiger, 2009). Entretanto, a produção de compostos promotores de crescimento necessita ser determinada em estudos posteriores para que se possa associar a presença deste hormônio vegetal ao maior acúmulo de peso fresco e seco das raízes de alface, e conseqüentemente, maior volume radicular.

A produção de fitohormônios (AIA, citocinina e giberelina) induzida por microrganismos, além de favorecer a formação de raízes secundárias contribui para o alongamento celular, a formação de gemas apicais e folhas novas. Portanto, as PGPR têm papel fundamental no maior acúmulo de biomassa vegetal decorrente a produção de folhas maiores e favorecimento do aumento da taxa fotossintética das plantas (Ferrara *et al.*, 2012; Vega-Celedón *et al.*, 2016). No presente estudo os probióticos BIO 21 pó e BS pó foram tanto misturados em substrato como aplicados via drench podendo ter contribuído para maior produção de fitohormônios e, conseqüentemente, colaborar com acúmulo de biomassa vegetal.

A ação das bactérias probióticas do gênero *Lactobacillus* na capacidade de promover crescimento vegetal é pouco relatada. No entanto, diferentes espécies do gênero *Bacillus* apresentam potencial de promoção de crescimento, especialmente *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis* e *B. thuringiensis* (Lopes *et al.*, 2018). Pacífico *et al.* (2021) observaram que cepas de *B. velezensis* produziram compostos semelhantes a AIA e sideróforos, solubilizaram fosfato, fixaram nitrogênio e colonizaram as raízes de algodão e promoveram o crescimento das plantas.

Nunes *et al.* (2023) também observaram que *B. subtilis* e *B. licheniformis*, aplicados individualmente, proporcionaram maior acúmulo de biomassa em plantas de tomate, sendo que as espécies produziram o composto AIA. Meng *et al.* (2016) também relataram que a *B. velezensis* promoveu crescimento de rabanete, em que foi observado a produção de auxina e NH₃, bem como apresentaram atividade de ACC-deaminase, substâncias essenciais para o crescimento das plantas.

Por outro lado, no presente estudo, os probióticos não foram eficientes no controle de *S. sclerotiorum* e *R. solani* em alface e soja, apresentando baixa redução de severidade da queima-da-saia da alface e do mofo-branco em soja e alface. Os probióticos BIO 21 líquido e BS líquido aplicados simultaneamente à inoculação dos patógenos aumentaram a severidade de queima-da-saia da alface quando comparados com a testemunha. Na cultura da soja, quando aplicados 24 horas antes

inoculação também aumentaram a severidade da doença, fato pela primeira vez relatado. Em relação ao controle de *S. sclerotiorum*, apesar da aplicação do BS líquido 24 horas antes da inoculação ter reduzido a severidade de mofo-branco em soja, apresentou comportamento semelhante à testemunha inoculada.

Diante desses resultados, é possível explicar que a agressividade dos fitopatógenos *R. solani* e *S. sclerotiorum* seja efeito da adubação nitrogenada realizada durante o plantio. O aporte excessivo de nitrogênio para obtenção de maior produtividade pode aumentar a suscetibilidade das plantas a doenças (Huber; Watson 1974). Considerando que, a alface possui alta capacidade de acumular esse nutriente mineral nas folhas na forma de nitrato, Ouhibi *et al.* (2015) e Ouhibi *et al.* (2023) comprovaram que o uso de adubação excessiva de nitrogênio na cultura aumenta a sua suscetibilidade ao ataque dos fitopatógenos *Botrytis cinerea* e *Sclerotinia minor* resultante da modificação do metabolismo da planta, onde alta presença de nitrogênio reduz a produção de polifenóis e conseqüentemente modifica o sistema de defesa da planta as doenças fúngicas. Lecompte *et al.* (2013) também relataram esse mesmo comportamento para o fitopatógeno necrotrófico *S. sclerotiorum*, mediado pelo acúmulo de açúcares da cultura da alface.

Apesar de no presente estudo os probióticos contendo *Bacillus* não apresentarem eficiência de controle das doenças, espécies do gênero *Bacillus* são relatadas controlando diferentes fungos fitopatogênicos, inclusive *R. solani* e *S. sclerotiorum* (Gao *et al.*, 2013; Peng *et al.*, 2013). Isolados de *Bacillus velezensis* reduziram a incidência de *Fusarium verticillioides* e *Alternaria linariae* em milho e tomate, respectivamente (Ferreira *et al.*, 2021; Silva Junior *et al.*, 2023). Pacífico *et al.* (2021) selecionaram as cepas de *B. velezensis* AP03, S2527 e S2545 para o controle do complexo *Fusarium*-nematóide no algodoeiro, por apresentarem eficiência no controle desses organismos.

As bactérias probióticas do gênero *Lactobacillus* apresentam potencial como agente de controle biológico de fitopatógenos. Chen *et al.* (2020) observaram que *L. plantarum* controlou *Botrytis cinerea*. Barrios-Roblero *et al.* (2019) demonstraram que *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. pentosus* apresentaram atividade antifúngica contra *Colletotrichum gloeosporioides*. *Lactobacillus* sp. reduziu a severidade da queima-da-bainha na cultura do arroz (Akhtar *et al.*, 2023). Deste modo, as bactérias pertencentes a este grupo de microrganismos são candidatas à aplicação no manejo de doenças, uma vez que apresentam características de rápido crescimento, capacidade de

competição, utilização de diferentes fontes de nutrientes, sobrevivência sob estresse e síntese de metabólitos (Santoyo *et al.*, 2012).

É importante ressaltar que os probióticos, mesmo sendo eficientes em promover o crescimento da alface, não foi observado o controle de *R. solani* e *S. sclerotiorum* em alface e soja. Considerando que, os ensaios foram conduzidos *in vitro* com temperatura favorável ao desenvolvimento do patógeno e a inoculação dos fitopatógenos foi realizada em disco de crescimento micelial com 10 dias de idade, o que possivelmente pode ter contribuído para alta concentração dos fitopatógenos, e conseqüentemente, para o alto índice de incidência e severidade das doenças. Novos ensaios devem ser conduzidos em diferentes condições ambientais, pois tem estudos na literatura comprovando a eficiência de bactérias probióticas no controle de diferentes fungos fitopatogênicos.

6 CONCLUSÕES

Os probióticos Bio 21 pó e BS pó promoveram O crescimento da alface, tanto quando foram aplicados no momento da sementeira em mistura no substrato e nas aplicações em mudas e alfaces transplantadas via drench realizadas semanalmente.

No entanto, os probióticos não apresentaram eficiência no controle de *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum* em mudas de alface e folhas de soja destacadas, tendo em alguns ensaios o aumento da severidade das doenças em relação a testemunha.

Referências

- ADAMS, G. C. *Thanatephorus cucumeris (Rhizoctonia solani)*, a species complex of wide host range. In: **Advances in Plant Pathology**. Academic Press, 1988. p. 535-552.
- ADREES, H. *et al.* Inducing systemic resistance in cotton plants against charcoal root rot pathogen using indigenous rhizospheric bacterial strains and chemical elicitors. **Crop Protection**, v. 115, p. 75-83, jan. 2019.
- AGROFIT. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. Disponível em: https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. 2021. Acesso em: 15 nov. 2023.
- AJAYI-OYETUNDE, O. O.; BRADLEY, C. A. *Rhizoctonia solani*: taxonomy, population biology and management of rhizoctonia seedling disease of soybean. **Plant Pathology**, v. 67, n. 1, p. 3-17, maio 2018.
- AKHTAR, M. *et al.* Biocontrol of *Rhizoctonia solani* in basmati rice by the application of *Lactobacillus* and *Weissella* spp. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 13855, ago. 2023.
- ALAOUI, K. *et al.* *In vitro* antifungal activity of *Lactobacillus* against potato Late blight *Phytophthora infestans*. **Materials Today: Proceedings**, v. 45, p. 7725-7733, 2021.
- AMORIM, L. *et al.* **Manual de Fitopatologia: Volume 2, Doenças das Plantas Cultivadas**. 6. Ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda., 2016.
- BAI, Y. *et al.* Plant growth-promoting rhizobacteria *Bacillus velezensis* JB0319 promotes lettuce growth under salt stress by modulating plant physiology and changing the rhizosphere bacterial community. **Environmental and Experimental Botany**, v. 213, p. 105451, 2023.
- BARRIOS-ROBLERO, C. *et al.* Antifungal lactic acid bacteria isolated from fermented beverages with activity against *Colletotrichum gloeosporioides*. **Food Bioscience**, v. 29, p. 47-54, jun. 2019.
- BEDENDO, I. P. Damping-off. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. 5. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2018. cap. 23., v.1, p. 323-327.
- BEDENDO, I.P.; MASSOLA JR., N.; AMORIM, L. Controles cultural, físico, biológico de doenças de plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 4.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011. cap. 17, v.1, p.367-388.
- BERNARDEAU, M. *et al.* Importance of the gastrointestinal life cycle of *Bacillus* for probiotic functionality. **Journal of Food Science and Technology**, v.54, n.8, p.2570-2584, 2017.

BETTIOL, W. Biopesticide use and research in Brazil. **Outlooks on Pest Management**, v. 22, n. 6, p. 280-283, dez. 2011.

BETTIOL, W. Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças em plantas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1991. cap. 1, p. 1-6.

BETTIOL, W. *et al.* Supressividade a fitopatógenos habitantes do solo. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: Uso e perspectivas**. 1. ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009, p.187-208.

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: Uso e perspectivas**. 1. ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009, p.187-208.

BHAKAT, A. *et al.* Plant growth promotion and lipopeptide-mediated biological control of chilli pathogen *Colletotrichum siamense* by endophytic *Bacillus* sp. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 125, p. 102026, maio 2023.

BONELLO, P. *et al* Systemic effects of *Heterobasidion annosum* infection on severity of *Diplodia pinea* tip blight and terpenoid metabolism in Italian stone pine (*Pinus pinea*). **Tree Physiology**, v. 28, p. 1653- 1660, set. 2008.

BUSBY, P. E.; RIDOUT, M.; NEWCOMBE, G. Fungal endophytes: modifiers of plant disease. **Plant Molecular Biology**, v. 90, p. 645-655, dez. 2016.

CAO, H. *et al.* Analysis of the activity and biological control efficacy of the *Bacillus subtilis* strain Bs-1 against *Meloidogyne incognita*. **Crop Protection**, v. 122, p. 125-135, ago. 2019.

CHAGAS JUNIOR, A. F. *et al.* *Bacillus* sp. como promotor de crescimento em soja *Bacillus* sp. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 44, n. 2-3, out. 2021.

CHEN, C *et al.* A novel endophytic strain of *Lactobacillus plantarum* CM-3 with antagonistic activity against *Botrytis cinerea* on strawberry fruit. **Biological Control**, v. 148, p. 104306, set. 2020.

CLEMENTE, J. M. *et al.* Use of *Bacillus* spp. as growth promoter in carrot crop. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 35, p. 3355-3359, set. 2016.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. The nature and practice of biological control of plant pathogens. **St. Paul: APS**, 1983.

CORREIA, K. C.; MICHEREFF, S. J. Fundamentos e desafios do manejo de doenças radiculares causadas por fungos. In: LOPES, U. E.; MICHEREFF, S.J. **Desafios do manejo de doenças radiculares causadas por fungos**. 1. ed. Recife: EDUFRPE, 2018. cap. 1, p. 1-16.

DALAL, J.; KULKARNI, N.; BODHANKAR, M. Antagonistic and plant growth promoting potentials of indigenous endophytic fungi of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). **Indian J Adv Plant Res**, v. 1, p. 9-16, 2014.

DI CAGNO, R. *et al.* Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. **Food Microbiology**, 33, p.1–10, 2013.

ELISASHVILI, V.; KACHLISHVILI, E.; CHIKINDAS, M.L. Recent advances in the physiology of spore formation for *Bacillus* probiotic production. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v.11, n.3, p.731-747, 2019.

ETESAMI, H.; JEONG, B. R.; GLICK, B. R. Biocontrol of plant diseases by *Bacillus* spp. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 126, p. 102048, jul. 2023.

FERRARA, F. I. S. *et al.* Endophytic and rhizospheric enterobacteria isolated from sugar cane have different potentials for producing plant growth-promoting substances. **Plant Soil**, v. 353 p. 409–417, 2012.

FERREIRA, D. F. SISVAR: A computer analysis system to fixed effects split plot type designs. **Revista Brasileira de Biometria**, [S.l.], v. 37, n. 4, p. 529-535, dec. 2019.

FERREIRA, T. C. *et al.* Potencial de *Bacillus* spp. em promover o crescimento e controlar *Fusarium verticillioides* em milho. **Summa Phytopathologica**, v. 47, p. 195-203, out-dez 2022.

FHOULA, I. *et al.* Diversity and antimicrobial properties of lactic acid bacteria isolated from rhizosphere of olive trees and desert truffles of Tunisia. **BioMed Research International**, n. 14, p. 1–14, 2013.

FRAVEL, D. R. Commercialization and implementation of biocontrol. **Annual Review Phytopathology**., v. 43, p. 337-359, set. 2005.

FREITAS, G. P. de. **Probióticos no controle de doenças e na promoção do crescimento do cafeeiro**. 2024. (Dissertação de Mestrado não publicada) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo, Brasil, 2024.

FUJII, A.; COOK, E. S. Probiotics. Antistaphylococcal and antifibrinolytic activities of omega. guanidino acids and. omega.-guanidinoacyl-L-histidines. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 12, p. 1409-1411, dez. 1973.

FULLER, R. Probiotic in man and animals.???? **Journal of Applied Bacteriology**., v. 66, p. 131-139, 1989.

GAO, X. *et al.* Biological control of oilseed rape *Sclerotinia* stem rot by *Bacillus subtilis* strain Em7. **Biocontrol Science and Technology**, v. 24, n. 1, p. 39-52, nov. 2014.

GHELARDI, E. *et al.* Current progress and future perspectives on the use of *Bacillus clausii*. **Microorganisms**, v.10, n.6, p.1246, 2022.

GORDON, R. E.; HAYNES, W. C.; PANG, C. H. N. **The genus *Bacillus***. Agricultural Research Service, US Department of Agriculture. 1973, 427p.

GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; SANTOS, Á. F. dos; AUER, C. G. Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. **Revista Floresta**, Curitiba, v. 30, n. 12, 2000.

GROSCH, R.; SCHNEIDER, J. H. M.; KOFOET, A. Characterisation of *Rhizoctonia solani* anastomosis groups causing bottom rot in field-grown lettuce in Germany. **European Journal of Plant Pathology**, v. 110, n. 1, p. 53-62, jan. 2004.

GUIMARÃES, A. *et al.* Anti-aflatoxigenic effect of organic acids produced by *Lactobacillus plantarum*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 264, p. 31-38, jan. 2018.

GUPTA, V.; GARG, R. Probiotics. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 27, n. 3, p. 202-209, set. 2009.

HOUTERMAN, P. M.; CORNELISSEN, B. J. C.; REP M. Suppression of plant resistance gene-based immunity by a fungal effector. **Plos Pathogens**, v. 4, n. 5, maio 2008.

HUBER, D. M.; WATSON, R. D. Nitrogen form and plant disease. **Annual review of phytopathology**, v. 12, n. 1, p. 139-165, 1974.

HUNTER, J. E. *et al.* Relationship between soil moisture and occurrence of *Sclerotinia sclerotiorum* and white mold disease on snap beans. **Protection Ecology**, v. 7, n. 4, p. 269-280, 1984.

IDRIS, E.E. *et al.* Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 20, n. 6, p. 619-626, 2007.

JONES, J. B.; JONES, J. P.; STALL, R. E.; ZITTER, T. A. **Compendium of tomato diseases**. American Phytopathological Society, 1991.

KANG, S. M. *et al.* Cucumber performance is improved by inoculation with plant growth-promoting microorganisms. **Acta Agriculturae Scandinavica, Section B—Soil & Plant Science**, v. 65, n.1, p. 36-44, 2015.

KHANEGHAH, A. M. *et al.* Interactions between probiotics and pathogenic microorganisms in hosts and foods: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 95, p. 205-218, 2020.

KÖHL, J.; KOLNAAR, R.; RAVENSBERG, W. J. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. **Frontiers in Plant Science**, p. 845, jul. 2019.

KÖHL, J.; KOLNAAR, R.; RAVENSBERG, W. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. **Frontiers in Plant Science**, p. 845, 2019.

KOHN, L. M. Delimitation of the economically important plant pathogenic *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, v. 69, p. 881-886, 1979.

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

LECOMPTE, F.; ABRO, M. A.; NICOT, P. C. Can plant sugars mediate the effect of nitrogen fertilization on lettuce susceptibility to two necrotrophic pathogens: *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum*?. **Plant and Soil**, v. 369, p. 387-401, 2013.

LEELASUPHAKUL, W.; HEMMANEE, P.; CHUENCHITT, S. 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, n. 1, p. 113-121, abr. 2008.

LIMANSKA, N. *et al.* Effect of *Lactobacillus plantarum* on germination and growth of tomato seedlings. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, p. 1587-1595, 2013.

LIU, W. *et al.* Biodiversity of lactic acid bacteria. *IN*: ZHANG, H.; CAI, Y. Lactic acid bacteria: Fundamentals and Practice, **Springer**, p. 103-203, 2014.

LOBO JÚNIOR, M. **Epidemiologia da podridão-de-esclerotínia em tomateiro para processamento industrial**. Orientador: Carlos Alberto Lopes. 1999. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, DF, 1999.

LOPES, C. A.; QUEZADO-DUVAL, A. M. **Comunicado técnico 14: Doenças da Alface**. Embrapa Hortaliças: Infoteca – E, 1998.

LOPES, C. A.; QUEZADO-DUVAL, A. M.; REIS, A. Doenças da Alface. Brasília, **Embrapa Hortaliças**, 68p., 2010.

LOPES, R. G. A indústria no controle biológico: Produção e comercialização de microrganismos no Brasil. *In*: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: Uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. cap. 2, p. 15-28.

LOPES, R.; TSUI, S.; GONÇALVES, P. J.; QUEIROZ, M. V. A look into a multifunctional toolbox: endophytic *Bacillus* species provide broad and underexploited benefits for plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 7, p. 1-10, 2018.

LUISE, D. *et al.* *Bacillus* spp. probiotic strains as a potential tool for limiting the use of antibiotics, and improving the growth and health of pigs and chickens. **Frontiers in Microbiology**, v.13, p.1-19, 2022.

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

MCDONALD, M. R.; BOLAND, G. J. Forecasting diseases caused by *Sclerotinia* spp. in Eastern Canada: fact or fiction? **Plant Pathology, London**, v.26, n. 4, p. 480 – 488, set. 2004.

MENG, Q.; JIANG, H.; HAO, J. J. Effects of *Bacillus velezensis* strain BAC03 in promoting plant growth. **Biological Control**, v. 98, p. 18-26, jul. 2016.

MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. **Trichoderma uso na agricultura**. Brasília: Embrapa, 2019, p. 538.

MICHEREFF, S. J. *et al.* Importância dos patógenos e das doenças radiculares em solos tropicais. *In*: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais. Recife: EDUFRPE**, 2005. cap. 1, p. 1-18.

MISHRA, S. *et al.* Comparative study on plant growth promotion by endophytic *Pseudomonas* spp. and *Bacillus* spp. of *Solanum lycopersicum*. **International Journal of Applied Sciences and Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 464-469, 2016.

NUNES, P. S. DE O. *et al.* *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* promote tomato growth. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 397-406, 2023.

ONGENA, M. *et al.* *Bacillus subtilis* M4 decreases plant susceptibility towards fungal pathogens by increasing host resistance associated with differential gene expression. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 692-698, dez. 2005.

OUHIBI, C. *et al.* Effects of nitrogen supply and of UV-C irradiation on the susceptibility of *Lactuca sativa* L to *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia minor*. **Plant and soil**, v. 393, p. 35-46, 2015.

OUHIBI, C. *et al.* Nitrogen supply effect on lettuce response to *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia minor*. **Journal of Plant Science and Phytopathology**, v. 7, n. 3, p. 118-123., 2023.

PACIFICO, M. G.; ECKSTEIN, B.; BETTIOL, W. Screening of *Bacillus* for the development of bioprotectants for the control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* and *Meloidogyne incognita*. **Biological Control**, v. 164, p. 104764, dez. 2021.

PAL, K.K.; GARDENER B.M. Biological Control of Plant Pathogens. **The Plant Health Instructor**. p1-25. 2006.

PANNULLO, A. *et al.* Genetic variation and structure of *Sclerotinia sclerotiorum* populations from soybean in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 44, n. 1, p. 53-64, dez. 2018.

PATHANIA, P. *et al.* Role of plant growth-promoting bacteria in sustainable agriculture. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, n. 30, p. 101842, 2020.

PENG, D. *et al.* Integrated biological and chemical control of rice sheath blight by *Bacillus subtilis* NJ-18 and jinggangmycin. **Pest Management Science**, v. 70, n. 2, p. 258-263, abr. 2014.

PEREIRA, R. B. *et al.* Tratamento de sementes de hortaliças. Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária, Circular Técnica, v. 140, 2015.

PERSELLO-CARTIEAUX, F.; NUSSAUME L.; ROBAGLIA, C. Tales from the underground: Molecular plant-rhizobacteria interactions. **Plant Cell and Environment**, v.26, p.186–199, jan. 2003.

PINTO, Z. V. *et al.* Controle da queima da saia em alface com isolados de *Trichoderma* spp. **Summa Phytopathologica**, v. 40, p. 141-146, jun. 2014.

PLAZA-DIAZ, J. *et al.* Mechanisms of action of probiotics. **Advances in Nutrition**, v. 10, n. 1, p. S49-S66, 2019.

- RAPOSO, R. da S.; DEFENSOR, R. H; GRAHL, T. R. Uso de probióticos na avicultura para o controle da *Salmonella* spp.: revisão de literatura e perspectivas de utilização. **Pubvet**, v. 13, p. 152, abr. 2019.
- SAGATA, E. **Métodos de inoculação e avaliação da resistência de genótipos de soja à *Sclerotinia sclerotiorum***. 2010. 74 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, 2010.
- SANTOS, R. B. *et al.* Probióticos: microrganismos funcionais. **Ciência Equatorial**, v. 1, n. 2, 2011.
- SARTI, G. C. *et al.* Inoculation with Biofilm of *Bacillus subtilis* Promotes the Growth of *Lactuca sativa*. **Sustainability**, v. 15, n. 21, p. 15406, 2023.
- SHAO, Z. *et al.* Rhizosphere bacteria biofertiliser formulations improve lettuce growth and yield under nursery and field conditions. **Agriculture**, v. 13, n. 10, p. 1911, 2023.
- SILVA JUNIOR, A. L. *et al.* Lipopeptide-enriched extracts of *Bacillus velezensis* B157 for controlling tomato early blight. **Crop Protection**, p. 106317, out. 2023.
- SNEH, B.; BURPEE, L.; OGOSHI, A. **Identification of Rhizoctonia species**. APS press, 1991.
- SOLER, A. *et al.* Field management of *Rotylenchulus reniformis* on pineapple combining crop rotation, chemical-mediated induced resistance and endophytic bacterial inoculation. **Crop Protection**, v. 141, p. 105446, mar. 2021.
- STRAGIER, P.; LOSICK, R. Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis*. **Annual Reviews of Genetics**, v.30, p.297-341, 1996.
- SUBBARAO, K. V. Lettuce drop. In: DAVIS, R.; SUBBARAO, K. V.; RAID, R. N.; KURTZ, E. A. **Compendium of Lettuce diseases**. American Phytopathological Society, 1997, p. 19-21.
- TAIZ, L., ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 848p. 2009.
- TOFOLI, J. G.; DOMINGUES, R. J. Doenças causadas por fungos. In: COLARICCIO, A.; CHAVES, A. L. R. (Eds.) **Aspectos fitossanitários da cultura da alface**. Boletim Técnico, Instituto Biológico, São Paulo – SP, n. 29, 126p., 2017.
- TSAVKELOVA, E.A. *et al.* Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: A review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.42, p.117–126, 2006.
- TU, J. C. Management of white mold of white beans in Ontario. **Plant Disease**, v. 73, n. 4, p. 281-285, 1989.
- VEGA-CALEDÓN, P. *et al.* Review Biosynthesis of índole-3-acetic acid and plant growth promoting by bactéria. **Cultivos Tropicales**, Vol. 37, p. 33-39, 2016.
- VERHOEF, H. Soil biota and activity. In: DOELMAN, P., EIJSACKERS, H. J. P. **Developments in Soil Science**., Elsevier, 2004. v. 29. p. 99–125.
- VINE, N. G.; LEUKES, W. D.; KAISER, H. Probiotics in marine larviculture. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, n. 3, p. 404-427, maio 2006.

YAN, Y. *et al.* *Bacillus velezensis* YYC promotes tomato growth and induces resistance against bacterial wilt. **Biological Control**, v. 172, p. 104977, set. 2022.