

MILENA CAMPOS DE OLIVEIRA ALENCAR VIANA

**BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE PLÂNTULAS DE TOMATEIRO COMO
INIBIDORAS DE CRESCIMENTO DE *Alternaria* sp.**

**São Cristóvão - SE
DEZEMBRO - 2023**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE – UFS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS APLICADAS – CCAA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA AGRONÔMICA – DEA

**BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE PLÂNTULAS DE TOMATEIRO COMO
INIBIDORAS DE CRESCIMENTO DE *Alternaria* sp**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Departamento de Engenharia Agrônômica – Universidade Federal de Sergipe, como requisito parcial para obtenção do título de Engenheira Agrônoma.

APROVADO EM: 11/12/2023

ORIENTADA: Milena Campos de Oliveira Alencar Viana

Documento assinado digitalmente



REGINA HELENA MARINO
Data: 05/02/2024 05:26:04-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof^ª. Dr^ª. Regina Helena Marino
(Orientadora)

Documento assinado digitalmente



PEDRO ROBERTO ALMEIDA VIEGAS
Data: 12/02/2024 19:25:26-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

**Prof. Dr. Pedro Roberto
Almeida Viégas**
(Banca examinadora)

**MARCOS CABRAL DE
VASCONCELLOS
BARRETTO:24853968504**

Assinado de forma digital por
MARCOS CABRAL DE VASCONCELLOS
BARRETTO:24853968504
Dados: 2024.02.19 09:56:12 -03'00'

**Prof. Dr. Marcos Cabral de
Vasconcellos Barretto**
(Banca examinadora)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que me apoiaram ao longo dessa jornada - sem vocês talvez eu sequer tivesse chegado até aqui. Por isso, dedico um obrigada especial às minhas amigas Sandy, Larissa, Louise, Jeangela, Iasmin e Daniela, que viveram comigo muitos dos meus piores momentos e, ainda assim, permaneceram ao meu lado. Guardarei a amizade de vocês para sempre.

Agradeço à minha família - Painho, Mainha, Avós, Thalles, Laryssa, Suyanne e Luen - pelo suporte e incentivo, por nunca deixarem que nada faltasse e nem permitirem que eu desistisse no meio do caminho. E, por mais que eu não diga isso com frequência, vocês são incríveis, eu amo vocês.

Não posso deixar de citar minha orientadora, Professora Regina Marino, que me acolheu e aconselhou durante a elaboração de toda esta pesquisa, sempre buscando o meu melhor. Sem ela, nada disso seria possível. Com uma menção honrosa às minhas colegas de laboratório Gabi e Júlia, que tornaram minhas tardes caóticas muito mais prazerosas.

Também gostaria de agradecer aos professores Pedro Viegas e Marcos Cabral, pela disponibilidade e carinho. É uma honra saber que meu trabalho será lido por profissionais que tanto admiro.

Por fim, deixo aqui meu agradecimento à uma pessoa muito especial, que sempre fez questão de me lembrar que eu sou capaz de chegar aonde eu quiser. Obrigada por ter existido em minha vida, você também é parte disso.

No mais, agradeço a todos os professores e colegas de curso pelas trocas de conhecimento, incentivo e por tornarem possível a conclusão de mais uma etapa na minha vida - Muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTAS DE FIGURAS.....	V
LISTAS DE TABELAS.....	VI
RESUMO.....	VII
RESUMO.....	VIII
INTRODUÇÃO.....	1
MATERIAL E MÉTODOS.....	2
Germinação e sanidade das sementes.....	2
Isolados bacterianos endofíticos.....	3
Seleção de bactérias endofíticas com potencial antagonista ao fungo <i>Alternaria</i> sp.....	3
Inibição do crescimento micelial do fungo fitopatogênico <i>Alternaria</i> sp. por bactérias endofíticas.....	4
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	5
Germinação e sanidade das sementes.....	5
Isolados bacterianos endofíticos.....	7
Seleção de bactérias endofíticas com potencial antagonista ao fungo <i>Alternaria</i> sp.....	7
Inibição do crescimento micelial do fungo fitopatogênico <i>Alternaria</i> sp. por bactérias endofíticas.....	10
CONCLUSÕES.....	15
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	16

LISTAS DE FIGURAS

- Figura 1.** Crescimento micelial do fungo fitopatogênico *Alternaria* sp. (ALT23) na presença de isolados bacterianos endofíticos obtidos de plântulas de cultivares de tomateiro, após cinco dias de cultivo* 5
- Figura 2.** Isolados bacterianos endofíticos obtidos e selecionados das cultivares de tomateiro cv. ‘Cereja’ (CB2, CB3, CB5 e CB6), cv. ‘Rasteiro Rio Grande’ (RB9A, RB10T, RB12, RB13, RB14 e RB15T) e cv. ‘Híbrido Chapolin’ (HB19A, HB22A) após 5 dias de cultivo (barra = 1cm)..9
- Figura 3.** Diâmetro micelial (cm) e velocidade de crescimento (cm.dia-1) do fungo fitopatogênico *Alternaria* sp. (TEST) cultivado em conjunto aos isolados bacterianos endofíticos das cultivares de tomateiro cv. ‘Cereja’ (CB2, CB3, CB5 e CB6), cv. ‘Híbrido Chapolin’ (HB19A e HB22A) e cv. ‘Rasteiro Rio Grande’ (RB9A, RB10T, RB12, RB13, RB14 e RB15T), após cinco dias de cultivo..... 10
- Figura 4.** Porcentagem de inibição do diâmetro micelial (PIC-DM) e da velocidade de crescimento (PIC-VM) do fungo fitopatogênico *Alternaria* sp. (TEST) cultivado em conjunto aos isolados bacterianos endofíticos das cultivares de tomateiro cv. ‘Cereja’ (CB2, CB3, CB5 e CB6), cv. ‘Rasteiro Rio Grande’ (RB9A, RB10T, RB12, RB13, RB14 e RB15T) e cv. ‘Híbrido Chapolin’ (HB19A e HB22A), após cinco dias de cultivo..... 11
- Figura 5.** Crescimento micelial do fungo fitopatogênico *Alternaria* sp. (ALT23) na presença dos isolados bacterianos endofíticos obtidos a partir de plântulas de cultivares do tomateiro cv. ‘Cereja’ (CB2 a CB6), cv. ‘Híbrido Chapolin’ (H19A e HB22A) e cv. ‘Rasteiro Rio Grande’ (RB9A, RB10T, RB12, RB13, RB14 e RB15T), após cinco dias de cultivo (Barra = 1 cm)..... 14

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1. Taxa de germinação das sementes das cultivares dos tomateiros Cereja e de mesa e fungos fitopatogênicos identificados, após cinco dias de cultivo.....	6
Tabela 2. Avaliação da alteração do formato (ALT-FORM) e intensidade de alteração (INT-ALT) do crescimento micelial do fungo fitopatogênico ALT23 (<i>Alternaria</i> sp.) na presença de isolados bacterianos endofíticos no 5° e 34° dias de cultivo.....	8
Tabela 3. Isolados bacterianos endofíticos, por cultivar dos tomateiros Cereja e de mesa, selecionados para avaliação da inibição do crescimento micelial do fungo fitopatogênico ALT23..	10
Tabela 4. Inibição do crescimento do fungo fitopatogênico <i>Alternaria</i> sp. (ALT23) na presença de bactérias endofíticas selecionadas de cultivares de tomateiro cv. 'Cereja' (CB2, CB3, CB5 e CB6), cv. 'Rasteiro Rio Grande' (RB9A, RB10T, RB12, RB13, RB14 e RB15T) e cv. 'Híbrido Chapolin' (HB19A e HB22A).....	13

RESUMO

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi elaborado segundo normas técnicas estabelecidas pela **Cadernos de Ciência & Tecnologia - CC&T**, para avaliação da banca examinadora e, posteriormente, será encaminhado à comissão editorial deste periódico. No controle do fungo fitopatogênico *Alternaria* sp., a aplicação de fungicidas é o método de controle mais utilizado, o que pode gerar consequências negativas ao meio ambiente. Para se obter uma abordagem mais sustentável, o presente trabalho avaliou o potencial antagonista das bactérias endofíticas isoladas de plântulas de tomateiro das cultivares Cereja, Rasteiro Rio Grande e Tomateiro cv. 'Híbrido Chapolin' sobre o crescimento micelial do fungo patogênico *Alternaria* sp. “in vitro”. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado composto pelo cultivo do isolado do fungo fitopatogênico *Alternaria* sp. em 13 tratamentos (Testemunha e 12 isolados bacterianos previamente selecionados) com quatro repetições. Em relação à testemunha, a taxa de inibição do diâmetro micelial variou de 29,8 a 64,2% e a velocidade de crescimento de 33,7 a 72,4% na presença das bactérias endofíticas, com destaque para os isolados CB3 (*Bacillus siamensis* KCTC 13613) e RB10T (*Bacillus velezensis* CR-502). As bactérias endofíticas isoladas do tomateiro Cereja e Rasteiro Rio Grande apresentam potencial de inibição contra o fungo fitopatogênico *Alternaria* sp. e podem ser uma alternativa ecológica e futura para uso no controle biológico.

PALAVRAS-CHAVE: Solanaceae, antagonismo, controle biológico, fitopatógeno

Bactérias endofíticas do tomateiro como inibidoras de crescimento de *Alternaria* sp.

Resumo: No controle do fungo fitopatogênico *Alternaria* sp., a aplicação de fungicidas é o método de controle mais utilizado, o que pode gerar consequências negativas ao meio ambiente. Para se obter uma abordagem mais sustentável, o presente trabalho avaliou o potencial antagonista das bactérias endofíticas isoladas de plântulas de tomateiro das cultivares Cereja, Rasteiro Rio Grande e Híbrido Chapolin sobre o crescimento micelial do fungo patogênico *Alternaria* sp. “in vitro”. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado composto pelo cultivo do isolado do fungo fitopatogênico *Alternaria* sp. em 13 tratamentos (Testemunha e 12 isolados bacterianos previamente selecionados) com quatro repetições. Em relação à testemunha, a taxa de inibição do diâmetro micelial variou de 29,8 a 64,2% e a velocidade de crescimento de 33,7 a 72,4% na presença das bactérias endofíticas, com destaque para os isolados CB3 (*Bacillus siamensis* KCTC 13613) e RB10T (*Bacillus velezensis* CR-502). As bactérias endofíticas isoladas do tomateiro Cereja e Rasteiro Rio Grande apresentam potencial de inibição contra o fungo fitopatogênico *Alternaria* sp. e podem ser uma alternativa ecológica e futura para uso no controle biológico.

Termos para indexação: Solanaceae, antagonismo, controle biológico, fitopatógeno

Tomato endophytic bacteria as growth inhibitors of *Alternaria* sp.

Abstract: In the control of the phytopathogenic fungus *Alternaria* sp., the application of fungicide is the most used control method, which can generate negative consequences for the environment. To obtain a more sustainable approach, the present work evaluated the antagonistic potential of endophytic bacteria isolated from tomato seedlings of the cultivars Cereja, Rasteiro Rio Grande and Híbrido Chapolin on the mycelial growth of the pathogenic fungus *Alternaria* sp. “in vitro”. The experimental design used was completely randomized, consisting of the cultivation of an isolate of the phytopathogenic fungus *Alternaria* sp. in 13 treatments (Control and 12 previously selected bacterial isolates) with four replications. In relation to the control, the inhibition rate of mycelial diameter ranged from 29.8 to 64.2% and the growth rate from 33.7 to 72.4% in the presence of endophytic bacteria, with emphasis on CB3 isolates (*Bacillus siamensis* KCTC 13613) and RB10T (*Bacillus velezensis* CR-502). The endophytic bacteria isolated from the tomato plant Cereja and Rasteiro Rio Grande have inhibition potential against the phytopathogenic fungus *Alternaria* sp. and can be an ecological and future alternative for use in biological control.

Index terms: Solanaceae, antagonism, biologic control, phytopathogen

INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) é uma importante cultura agrícola no Brasil. Entretanto, esta espécie sofre com perdas significativas principalmente devido a incidência de fungos, bactérias, vírus ou insetos pragas, quando atingem potencial de dano econômico (Teixeira, 2022).

Na agricultura convencional, o controle de fitopatógenos tem sido comumente realizado através do uso de agrotóxicos, o que pode gerar consequências nocivas ao meio ambiente e aos seres humanos (Sharma et al., 2021, 2023).

No tomateiro, Töfoli & Domingues (2018) mencionaram que os fungos fitopatogênicos do gênero *Alternaria* possuem alta agressividade, cujo controle pode ser feito pelo uso de fungicidas ou pelo manejo da cultura, como: evitar o plantio em épocas favoráveis à doença, realizar rotação de culturas com famílias de plantas não-alvo ao patógeno, eliminação de restos culturais e a escolha de cultivares resistentes.

De forma alternativa ao controle químico, as bactérias endofíticas que vivem internamente nas plantas podem sintetizar metabólitos secundários, tais como fenóis, quinonas e alcalóides, bem como podem liberar enzimas líticas responsáveis pela degradação da parede celular fúngica ou pela redução da disponibilidade de nutrientes aos patógenos; e produzir lipopeptídeos ou compostos voláteis, os quais são capazes de inibir o crescimento do patógeno ou induzir a resistência sistêmica no vegetal, o que reduz a incidência de doenças (Morales-Cadeño et al., 2021).

Em relação ao controle biológico de fungos pertencentes ao gênero *Alternaria*, Töfoli & Domingues (2018) relataram que o uso de produtos à base de *Bacillus pumilus* aplicados de forma preventiva no solo ou no substrato de produção das mudas, têm mostrado eficiência no controle deste fitopatógeno.

Por sua vez, Hazarika et al. (2019) constataram que a bactéria endofítica *Bacillus subtilis* das folhas da cana-de-açúcar possui ação antifúngica contra os patógenos *Alternaria* e *Fusarium*. Da mesma forma, Sharma et al. (2021) mencionaram que a bactéria endofítica *Bacillus siamensis*, obtida das plântulas de duas variedades indianas de tomateiro (Pusa Ruby e uma variedade local), apresentou potencial antagonista “*in vitro*” contra os fungos fitopatogênicos *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*, *Verticillium lateritium* e *Alternaria solani*.

Na literatura, até o presente, não foram encontradas referências correlacionadas ao uso de bactérias endofíticas do tomateiro cereja e de cultivares do tomateiro de mesa cultivados no Brasil que visem o controle de fitopatógenos da própria cultura, as quais podem ter melhor adaptação e eficiência sobre o controle biológico de fitopatógenos, quando comparado aos micro-organismos obtidos de outros tipos de plantas.

O atual experimento buscou isolar, identificar e avaliar a inibição “in vitro” de bactérias endofíticas do tomateiro sobre o crescimento micelial do fungo do fitopatogênico *Alternaria* sp. com o intuito de buscar uma alternativa ecológica para o controle deste patógeno.

MATERIAL E MÉTODOS

Germinação e sanidade das sementes

Os micro-organismos endofíticos utilizados foram obtidos de plântulas de tomateiro das cultivares Cereja (REF 261), Rasteiro Rio Grande (REF 265) e Híbrido Chapolín (REF 268), cujas sementes não foram tratadas quimicamente ou passaram por transgenia, e eram provenientes do fabricante brasileiro ISLA Sementes Ltda.

A cultivar do tomateiro cereja utilizada não apresenta resistência a nenhum patógeno. O tomateiro cv. ‘Rasteiro Rio Grande’ possui resistência à murcha do *Fusarium* 1 e 2 e murcha de *Verticillium*. O tomateiro cv. ‘Híbrido Chapolín’ apresenta tolerância ao Vírus do encarquilhamento (Tomato leaf curl virus – ToLCV), à Pinta preta (*Alternaria* sp.), à requeima, à murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum*), a nematoides e aos fatores abióticos, tais como: estresse térmico e hídrico (ISLA, 2023).

Foram selecionadas 50 sementes de cada cultivar, posteriormente submetidas à desinfecção superficial pela imersão em álcool 70%, hipoclorito de sódio 0,2%, seguido pela tríplex lavagem em água destilada autoclavada durante 1 minuto em cada solução.

A cada 25 sementes desinfestadas, foi realizada a distribuição em caixas do tipo Gerbox com três folhas de papel de filtro qualitativo autoclavadas e umedecidas em água destilada autoclavada. Foram realizadas duas repetições por cultivar.

A incubação foi feita em BOD a 28 ± 1 °C com fotoperíodo de 8 h de luz durante cinco dias, onde foram adicionados 5 mL de água destilada autoclavada apenas no segundo dia após a semeadura.

A partir desse processo, foram analisadas a taxa de germinação das sementes, a sanidade das sementes, o pH da água destilada e a condutividade elétrica da água destilada.

A taxa de germinação (G, %) das sementes foi determinada pela equação: $G (\%) = (\text{número de sementes germinadas} \times 100) / \text{número total de sementes}$.

A sanidade das sementes foi avaliada pela taxa de contaminação por fitopatógenos nas sementes pela equação: $C (\%) = (\text{número de sementes contaminadas} \times 100) / \text{número total de sementes}$. A identificação taxonômica dos fungos fitopatogênicos foi realizada com base nas características morfológicas da estrutura reprodutiva segundo Barnett e Hunter (1998).

O pH e a condutividade elétrica foram determinados segundo Silva (2009).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANAVA) e nos casos em que houve diferença significativa, aplicou-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade pelo programa SISVAR.

Isolados bacterianos endofíticos

Uma vez produzidas as plântulas das cultivares de tomateiro para obtenção das bactérias endofíticas, foi realizada a retirada de fragmentos de até 0,5 cm da radícula ou dos folíolos das plântulas selecionadas com base no desenvolvimento vegetativo, após o teste de germinação e sanidade realizado no bioensaio anterior.

A cada quatro fragmentos de plântulas, o material vegetal foi transferido para meio de cultura à base de batata-dextrose-ágar (BDA comercial, 39 g.L⁻¹) acondicionado em placas de Petri. Foram realizadas três repetições por cultivar com incubação realizada em BOD a 28 ± 1 °C com fotoperíodo de 8 h de luz durante cinco dias.

A variável analisada foi o número de bactérias endofíticas por cultivar, obtido após a realização da diluição em série até 10⁻³ das colônias bacterianas observadas por cultivar, segundo a metodologia de Madigan et al. (2004) com modificações, com o intuito de obter culturas bacterianas puras.

Para isto, foi transferido um disco de meio de cultura colonizado pelo isolado bacteriano de 6 mm para um tubo de ensaio com 10 mL de água destilada autoclavada e agitado com auxílio do Vortex. Posteriormente, foi retirada uma alíquota de 1 mL da solução que continha o disco colonizado pela bactéria e transferida para tubos de ensaio com 9 mL de água destilada autoclavada (diluição de 10⁻¹) e agitado novamente. O processo foi repetido até a diluição de 10⁻³. A partir da última diluição (10⁻³) foi transferida uma alíquota de 1 mL da solução, para placas de Petri com meio de cultura BDA comercial e distribuída sobre o meio com auxílio da alça de Drigalski. A incubação foi realizada em BOD a 28 ± 1 °C com fotoperíodo de 8 h de luz durante cinco dias.

As colônias bacterianas obtidas foram quantificadas e identificadas pelas siglas CB (Tomateiro cv. 'Cereja'), RB (Tomateiro cv. 'Rasteiro Rio Grande') e HB (Tomateiro cv. 'Híbrido Chapolin'), seguidas pela numeração sequencial.

Os micro-organismos endofíticos obtidos foram conservados em tubos de ensaio com meio BDA em geladeira a 4 °C.

Seleção de bactérias endofíticas com potencial antagonista ao fungo *Alternaria sp.*

O isolado do fungo fitopatogênico de *Alternaria sp.*, agente causal de manchas foliares e da Pinta preta no tomateiro, utilizado no bioensaio foi o ALT23. O inoculante fúngico foi obtido a partir do tomate que apresentou os sintomas característicos da doença. Foram retirados fragmentos do fruto e transferidos para placas de Petri com meio de cultura BDA comercial. A incubação foi realizada em BOD a 28 ± 1 °C com fotoperíodo de 8 h de luz durante sete dias.

Foi realizado um bioensaio para a seleção das bactérias endofíticas antagonistas de *Alternaria* sp., onde no centro de placas de Petri com meio BDA, foi posicionado um disco micelial do fungo fitopatogênico com 5 mm de diâmetro e quatro discos de papel de filtro autoclavados de 5 mm de diâmetro e umedecidos com água destilada autoclavada que foram imersos, isoladamente, em cada colônia bacteriana obtida anteriormente, distribuídas ao seu redor. O cultivo foi realizado em BOD a 28 ± 1 °C com fotoperíodo de 8 h de luz durante 34 dias.

As variáveis analisadas foram: a alteração do formato e da intensidade de alteração do crescimento micelial do fungo fitopatogênico na presença dos isolados bacterianos endofíticos aos 5 dias da inoculação. A alteração formato (ALT-FORM) do crescimento micelial do fungo fitopatogênico frente às bactérias endofíticas foi avaliada pelo critério subjetivo, em que: (+) altera e inibe o crescimento e (-) não altera e não inibe o crescimento, em comparação ao crescimento característico deste isolado fúngico fitopatogênico.

A intensidade de alteração (INT-ALT) do crescimento micelial do fungo ALT23 foi avaliada aos 34 dias de cultivo pelo critério subjetivo: Moderado e Forte, em que: “moderado” indica pouca inibição do crescimento micelial; e “forte” equivale a redução ou alteração intensa do crescimento micelial.

As bactérias classificadas como “fortes” foram selecionadas para a avaliação de inibição do crescimento micelial do fungo fitopatogênico *Alternaria* sp. e identificadas a nível de espécie pelo método de sequenciamento de DNA da região 16S do ribossomo através do sistema taxonômico EzBiocloud.

Inibição do crescimento micelial do fungo fitopatogênico *Alternaria* sp. por bactérias endofíticas

Para avaliar a taxa de inibição do crescimento micelial do isolado ALT23 pelos isolados bacterianos endofíticos foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado composto por 13 tratamentos com quatro repetições: testemunha (fungo fitopatogênico, sem inoculação de isolados bacterianos) e 12 isolados bacterianos (CB2, CB3, CB5, CB6, HB19A, HB22A, RB9A, RB10T, RB12, RB13, RB14 e RB15T). Os isolados bacterianos utilizados neste bioensaio foram selecionados no bioensaio anterior conforme a intensidade de alteração do crescimento micelial do fungo fitopatogênico.

A metodologia utilizada foi a mesma descrita no item anterior, entretanto, foi estabelecida uma distância de 2,5 cm entre o disco micelial do fungo e os quatro inóculos bacterianos em placas de Petri com meio BDA comercial. A incubação foi realizada à temperatura ambiente durante cinco dias.

As variáveis analisadas foram: o diâmetro micelial (DM), a velocidade de crescimento (VM), a porcentagem de inibição do diâmetro micelial (PIC-DM) e da velocidade de crescimento (PIC-VM), a intensidade de inibição do crescimento micelial (IN-ALT) e o odor.

O diâmetro micelial (DM, em cm) foi obtido pela média de duas medições cruzadas do crescimento do fungo fitopatogênico com auxílio de régua milimetrada, após o quinto dia de cultivo.

A velocidade de crescimento (VM, em cm.dia^{-1}) foi avaliada pela equação: $VM = (A-B)/C \times 100$, em que: A = valor do diâmetro micelial final, B = valor do diâmetro micelial inicial e C = intervalo de tempo em dias. O diâmetro inicial utilizado foi o disco micelial de 5 mm do meio de cultura colonizado pelo fungo ALT23. A velocidade de crescimento micelial foi avaliada após o quinto dia de cultivo.

A porcentagem de inibição do diâmetro micelial (PIC-DM, %) e da velocidade de crescimento (PIC-VM, %) foi calculada pela equação: $PIC = (D - E)/D \times 100$, em que: D = valor da variável analisada no tratamento testemunha (ALT23), sem inoculação do isolado bacteriano endofítico e E = valor da variável analisada no tratamento com a presença da bactéria endofítica.

A intensidade de inibição do crescimento do fungo fitopatogênico ALT23 (IN-ALT) foi classificada como Moderado, Forte e Muito Forte, em que: “moderado” = inibição do crescimento micelial inferior a 40%; “forte” = inibição do crescimento micelial superior a 40% e inferior a 45%; “muito Forte” = inibição do crescimento micelial superior a 45% (Figura 1).



Figura 1. Crescimento micelial do fungo fitopatogênico *Alternaria* sp. (ALT23) na presença de isolados bacterianos endofíticos obtidos de plântulas de cultivares de tomateiro, após cinco dias de cultivo*

*Classificação do crescimento micelial do fungo ALT23: (A): Crescimento típico; (B) Alteração Moderada; (C) Alteração Forte; (D) Alteração Muito Forte

O odor do meio de cultivo foi classificado como suave, forte ou ausente, após quinto dia de cultivo.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANAVA) e nos casos em que houve diferença significativa aplicou-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade pelo programa SISVAR.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Germinação e sanidade das sementes

A taxa de germinação média foi de 82,7% das sementes do tomateiro, sem diferença significativa entre as cultivares testadas (Tabela 1). Em relação aos dados fornecidos pelo fabricante, a germinação ocorreu dentro do período indicado de 5 a 14 dias, mas com taxas de germinação média inferiores ao estimado de 95% (ISLA, 2023).

Tabela 1. Taxa de germinação das sementes das cultivares dos tomateiros Cereja e de mesa e fungos fitopatogênicos identificados, após cinco dias de cultivo

Cultivar	Germinação (%)	Fungos fitopatogênicos	Podridão das sementes	Fungos Endofíticos	Sementes Favorecidas
Cereja	88,0 a*	<i>Rhizoctonia</i> sp. <i>Aspergillus</i> sp. 1 <i>Aspergillus</i> sp. 2	18%	-	-
Rasteiro Rio Grande	96,0 a	<i>Aspergillus</i> sp. 3 <i>Aspergillus</i> sp. 4.	8%	<i>Aspergillus niger</i>	12%.
Híbrido Chapolin	64,0 a	-	-	<i>Aspergillus niger</i>	2%
CV (%)	16,8				

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade

Dentre os fatores que podem ter influenciado na taxa de germinação das sementes das cultivares de tomateiro pode-se considerar a presença de fungos fitopatogênicos, pois podem gerar danos às sementes, como podridões de pré-emergência ou pós-emergência (Menten, 2022). Enquanto os micro-organismos endofíticos não causam danos às sementes ou plântulas, a depender da interação com a planta hospedeira e são capazes de atuar de forma benéfica às plantas, uma vez que estimulam ou atuam diretamente no sistema de defesa vegetal ou na promoção de crescimento (Azevedo, 1998; Sharma, 2021).

Nas sementes do tomateiro cv. 'Cereja' foram identificados os fungos fitopatogênicos *Rhizoctonia* sp. e dois isolados de *Aspergillus* spp., que causaram a podridão de 18% das sementes e plântulas. Nesta cultivar não foram observados fungos endofíticos. No tomateiro cv. 'Rasteiro Rio Grande' também foram identificadas dois isolados de *Aspergillus* spp. como fungos fitopatogênicos por terem promovido podridão em 8% das plântulas. Neste tratamento, o *Aspergillus niger* com conidioma de coloração preta, não promoveu danos às plântulas, o que caracteriza um comportamento típico de fungo endofítico em 12%. Da mesma forma, no tomateiro cv. 'Híbrido Chapolin', apenas o *Aspergillus niger* com conidioma preto foi identificado, o qual também apresentou comportamento endofítico em 2% das plântulas (Tabela 1).

Outro fator importante a ser considerado na germinação das sementes é o pH e a condutividade elétrica da água utilizada no umedecimento durante a condução do bioensaio. Para o tomateiro, recomenda-se que a água apresente uma condutividade elétrica (CE) de 1,5 mS/cm e pH entre 5,5 e 6,5 (Miranda, 2023), pois podem influenciar no crescimento de plântulas e na velocidade de germinação (Krzyzanowski, 2022).

Neste trabalho, o pH médio da água destilada autoclavada utilizada no umedecimento do papel durante o teste de germinação foi de 8,2 e de 7,7 na água destilada não autoclavada, valores estes superiores aos indicados para o tomateiro, o que pode ter afetado a germinação das sementes e ter favorecido o crescimento de patógenos.

Em relação à condutividade elétrica, os valores relacionam a intensidade da corrente elétrica entre dois pontos pela quantidade de lixiviados, para determinar o vigor das sementes, onde maiores valores equivalem a um menor vigor e maior perda de nutrientes e sais (Silva et al., 2014). O processo de autoclavagem da água destilada resultou no aumento desta variável de 2,8 para 9,15 mS/cm, o que também pode ter interferido na germinação e no desenvolvimento das plântulas, uma vez que se apresentou muito alta em relação ao recomendado para o tomateiro.

Isolados bacterianos endofíticos

O número de isolados bacterianos endofíticos obtidos pelo método de diluição em série foi equivalente a seis no tomateiro cv. 'Cereja' (isolados de CB1 a CB6), onze no tomateiro cv. 'Rasteiro Rio Grande' (isolados de RB9A a RB16) e seis no tomateiro cv. 'Híbrido Chapolin' (isolados de HB17 a HB23).

Seleção de bactérias endofíticas com potencial antagonista ao fungo *Alternaria* sp.

Não foram encontradas referências quanto ao uso de bactérias endofíticas do tomateiro cereja e de cultivares do tomateiro de mesa cultivados no Brasil que visem o controle de fitopatógenos da própria cultura, porém o uso de bactérias endofíticas na redução do crescimento micelial de fungos fitopatogênicos já foi descrito na literatura. Em trabalho realizado por Souza (2018), os isolados de *Bacillus* spp. obtidos de partes vegetativas de citros apresentaram inibição do crescimento de *Alternaria alternata* no cultivo "in vitro" em um período de 7 dias. Sharam et al. (2021) constataram a ação antagonista em bactérias endofíticas do gênero *Bacillus* sp. contra fungos fitopatogênicos do tomateiro *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*, *Verticillium lateritium* e *Alternaria solani* também em um período de 7 dias.

No presente trabalho, os isolados bacterianos obtidos de cultivares do tomateiro promoveram a alteração do formato do crescimento micelial do isolado ALT23 do fungo fitopatogênico *Alternaria* sp. desde o 5º dia de cultivo, com exceção à CB2, CB4 e CB5 do tomateiro cv. 'Cereja' e RB9A e RB13 do tomateiro cv. 'Rasteiro Rio Grande'. Ao realizar a avaliação no 34º dia de cultivo, foi possível constatar que todos os isolados bacterianos apresentaram ação sobre o crescimento micelial do fungo fitopatogênico ALT23 (Tabela 2).

Tabela 2. Avaliação da alteração do formato (ALT-FORM) e intensidade de alteração (INT-ALT) do crescimento micelial do fungo fitopatogênico ALT23 (*Alternaria* sp.) na presença de isolados bacterianos endofíticos no 5º e 34º dias de cultivo

Cultivar	Isolado bacteriano	ALT-FORM*		INT-ALT
		5º dia	34º dia	34º dia
Cereja	CB1	+	+	Moderada
	CB2	-	+	Forte
	CB3	+	+	Forte
	CB4	-	+	Moderada
	CB5	-	+	Forte
	CB6	+	+	Forte
Rasteiro Rio Grande	RB9A	+	+	Forte
	RB9T	-	+	Moderada
	RB10A	+	+	Moderada
	RB10T	+	+	Forte
	RB11A	+	+	Moderada
	RB11T	+	+	Moderada
	RB12	+	+	Forte
	RB13	-	+	Forte
	RB14	+	+	Forte
	RB15T	+	+	Forte
RB16	+	+	Forte	
Híbrido	HB17	+	+	Moderada
	HB19T	+	+	Moderada
Chapolin	HB21	+	+	Moderada
	HB22A	+	+	Forte
	HB22T	+	+	Moderada
	HB23	+	+	Moderada

* Avaliação subjetiva, em que (+) = Altera o crescimento micelial do fitopatógeno; (-) = Ausência de alteração do crescimento micelial do fitopatógeno

Em relação à intensidade de alteração, os isolados CB2, CB3, CB5, CB6, RB9A, RB10T, RB12, RB13, RB14, RB15T, RB16 e HB22A foram os que promoveram forte alteração no crescimento micelial, após 34 dias de cultivo (Tabela 2).

Do total de bactérias obtidas, foram selecionados 12 isolados bacterianos (CB2, CB3, CB5, CB6, RB9A, RB10T, RB12, RB13, RB14, RB15T e HB10A, HB22A) (Figura 2), por promoverem alteração avaliada como “forte” no formato do micélio do fungo fitopatogênico *Alternaria* sp., após 34 dias de cultivo.

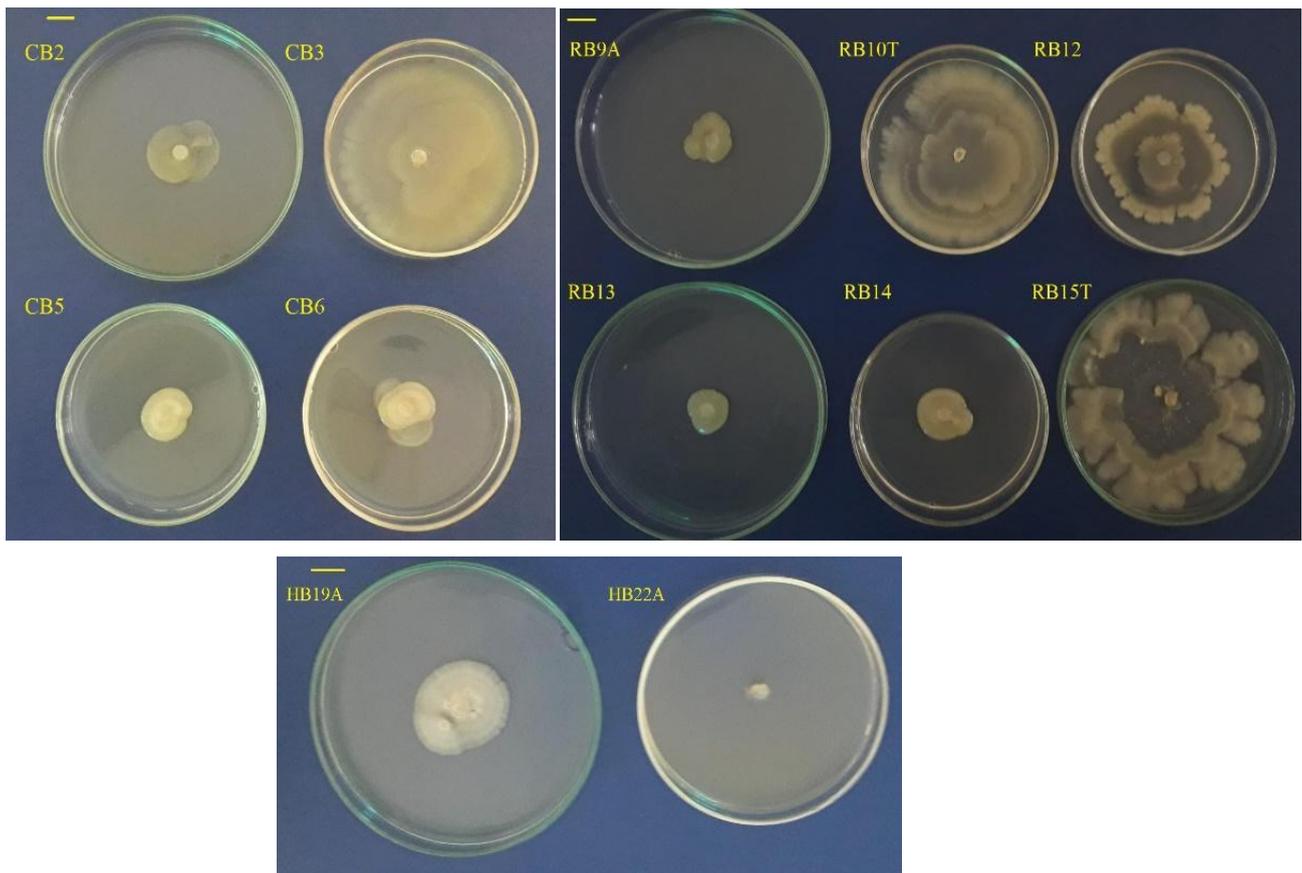


Figura 2. Isolados bacterianos endofíticos obtidos e selecionados das cultivares de tomateiro cv. ‘Cereja’ (CB2, CB3, CB5 e CB6), cv. ‘Rasteiro Rio Grande’ (RB9A, RB10T, RB12, RB13, RB14 e RB15T) e cv. ‘Híbrido Chapolin’ (HB19A, HB22A) após 5 dias de cultivo (barra = 1cm)

Os isolados bacterianos endofíticos selecionados foram identificados e apresentaram alta taxa de similaridade com espécies dos gêneros *Bacillus*, *Paenibacillus* e *Burkholderia*. No tomateiro cv. ‘Cereja’ foram encontradas as bactérias *Paenibacillus ottowii* MS237 e *Bacillus siamensis* KCTC 13613 com similaridade entre 99,22 e 99,93%. Já para a cultivar de tomateiro Rasteiro Rio Grande a relação de similaridade foi de 100% para *Bacillus velezensis* CR-502 em RB10T e para *Bacillus subtilis* NCIB 3610 em RB12. No tomateiro cv. ‘Híbrido Chapolin’ apenas a bactéria *Burkholderia territorii* LMG 28158 foi identificada, com 99,79% em todos os isolados (Tabela 3).

Tabela 3. Isolados bacterianos endofíticos, por cultivar dos tomatesiros Cereja e de mesa, selecionados para avaliação da inibição do crescimento micelial do fungo fitopatogênico ALT23

Cultivar	Isolado bacteriano	Espécie	Similaridade (%)
Cereja	CB2	<i>Paenibacillus ottowii</i> MS2379	99,82
	CB3	<i>Bacillus siamensis</i> KCTC 13613	99,93
	CB5	<i>Paenibacillus ottowii</i> MS2379	99,56
	CB6	<i>Paenibacillus ottowii</i> MS2379	99,32
Rasteiro Rio Grande	RB9A	<i>Paenibacillus ottowii</i> MS2379	99,55
	RB10T	<i>Bacillus velezensis</i> CR-502	100
	RB12	<i>Bacillus subtilis</i> NCIB 3610	100
	RB13	<i>Paenibacillus ottowii</i> MS2379	99,57
	RB14	<i>Paenibacillus ottowii</i> MS2379	99,47
	RB15T	<i>Bacillus velezensis</i> CR-502	99,85
Híbrido	HB19A	<i>Burkholderia territorii</i> LMG 28158	99,79
Chapolin	HB22A	<i>Burkholderia territorii</i> LMG 28158	99,79

Inibição do crescimento micelial do fungo fitopatogênico *Alternaria* sp. por bactérias endofíticas

Todos os isolados bacterianos endofíticos selecionados nas três cultivares avaliadas reduziram significativamente o crescimento avaliado com base no diâmetro micelial e na velocidade de crescimento micelial do fungo fitopatogênico *Alternaria* sp. em relação à testemunha (Figura 3).

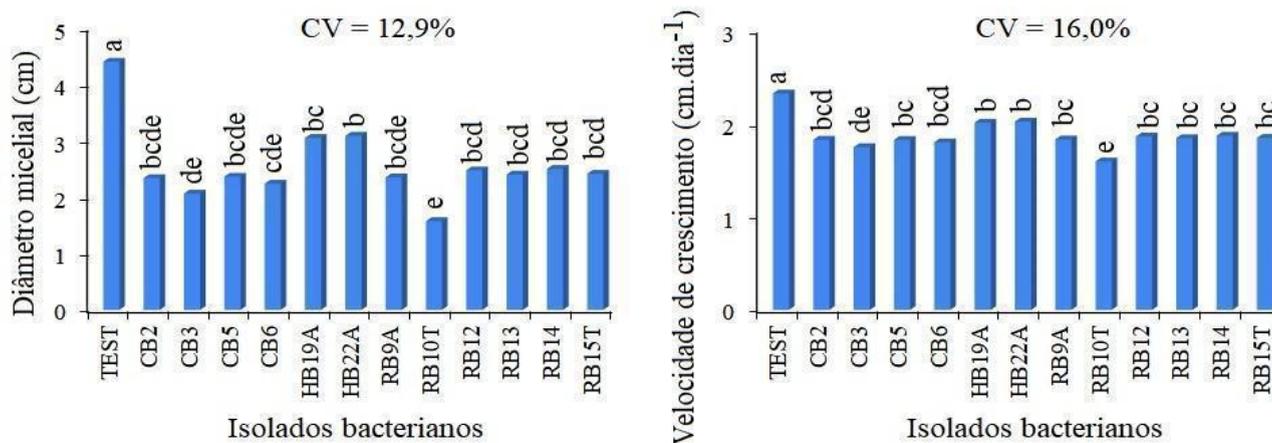


Figura 3. Diâmetro micelial (cm) e velocidade de crescimento (cm.dia⁻¹) do fungo fitopatogênico *Alternaria* sp. (TEST) cultivado em conjunto aos isolados bacterianos endofíticos das cultivares de tomateiro cv. 'Cereja' (CB2, CB3, CB5 e CB6), cv. 'Híbrido Chapolin' (HB19A e HB22A) e cv. 'Rasteiro Rio Grande' (RB9A, RB10T, RB12, RB13, RB14 e RB15T), após cinco dias de cultivo

Em relação à testemunha do fungo fitopatogênico de *Alternaria* sp. (ALT23), a taxa de inibição do diâmetro micelial (PIC-DM) variou de 29,8 a 64,2% e a velocidade de crescimento (PIC-VM) foi de 33,7 a 72,4% (Figura 4).

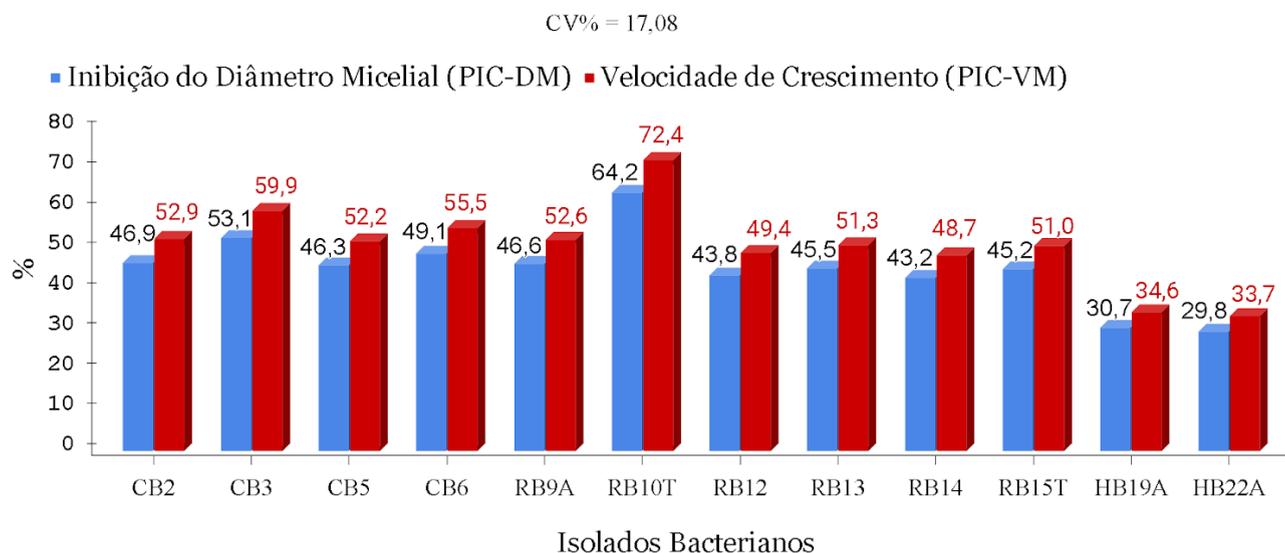


Figura 4. Porcentagem de inibição do diâmetro micelial (PIC-DM) e da velocidade de crescimento (PIC-VM) do fungo fitopatogênico *Alternaria* sp. (TEST) cultivado em conjunto aos isolados bacterianos endofíticos das cultivares de tomateiro cv. ‘Cereja’ (CB2, CB3, CB5 e CB6), cv. ‘Rasteiro Rio Grande’ (RB9A, RB10T, RB12, RB13, RB14 e RB15T) e cv. ‘Híbrido Chapolin’ (HB19A e HB22A), após cinco dias de cultivo.

Entre os tratamentos do tomateiro cv. ‘Cereja’, o isolado bacteriano CB3 (*Bacillus siamensis* KCTC 13613) se destacou quanto a porcentagem de inibição do diâmetro micelial de 53,1% (Figura 4) e todos os isolados bacterianos apresentaram porcentagem de velocidade da inibição de crescimento do fungo fitopatogênico *Alternaria* sp. maiores que 50%.

No tomateiro cv. ‘Rasteiro Rio Grande’, o isolado RB10T (*Bacillus velezensis* CR-502) se destacou em ambas as variáveis analisadas. A viabilidade do uso de produtos à base de *Bacillus* como controle biológico de fungos do gênero *Alternaria* é uma tecnologia a ser explorada, como no estudo realizado por Moura (2020), onde foram testadas formulações à base de *Bacillus* spp., na qual foi constatada eficiência na inibição da germinação do desenvolvimento de colônias do fungo fitopatogênico *A. alternata* por *Bacillus subtilis*. Além disso, o trabalho de Almeida (2023), apontou eficiência no antagonismo de *Bacillus velezensis* LABIM40 (cepa CMRP 4489) avaliado “in vitro” contra fungos fitopatogênicos *Alternaria linariae*, *Botryotinia squamosa*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Gibberella zeae* e *Rhizoctonia solani*, reduzindo a incidência de *R. solani* em 57%. No presente trabalho, a presença do isolado bacteriano RB10T (*Bacillus velezensis* CR-502) obtido a partir de plântulas de tomateiro apresentou inibição do diâmetro micelial de 64,4% e de 72,4% na velocidade de

crescimento em relação à testemunha do fungo fitopatogênico *Alternaria* sp. (Figura 4), alcançando um resultado bastante promissor para uso como controle biológico quando comparado aos dados obtidos por Almeida (2023) e pelo estudo de Graf et al. (2021) que avaliou o potencial do uso de óleo essencial extraído de folhas de cataia (*Drimys brasiliensis* Miers) como fungicida no controle do crescimento micelial do fungo *Alternaria porri* “in vitro”, cuja o maior índice de inibição atingido foi de 55% sob dose de 500 ppm em relação à testemunha e, portanto, inferior aos valores descritos para o isolado bacteriano RB10T.

Uma análise “in vitro” realizada por Diniz (2022) afirmou a atividade antagonista de *Bacillus velezensis* através da produção de lipopeptídeos e *Paenibacillus ottowii* pela produção de polimixina contra o fungo *Fusarium verticillioides*. Diniz (2022) também apontou que a combinação de *P. ottowii* e *B. velezensis* como eficientes promotores de crescimento vegetal no milho. Ambas espécies foram identificadas no tomateiro cv. ‘Cereja’ e cv. ‘Rasteiro Rio Grande’ com bons resultados na inibição do patógeno *Alternaria* sp. nesta pesquisa.

As bactérias do gênero *Burkholderia*, encontradas no tomateiro cv. 'Híbrido Chapolin', também possuem atividade antagonista conhecida, como mostrado pela pesquisa de Brito et al. (2018), onde *Burkholderia* sp. extraído como endofítico de plantas de milho apresentou comportamento inibitório contra os fungos fitopatogênicos *Colletotrichum musae*, *Giberela zae* e *Macrophomina phaseolina* com uma zona de inibição do diâmetro fúngico de 36%, 32% e 26%, respectivamente, em avaliação de sete dias. Em comparação com o presente estudo, apesar dos tratamentos HB19A e HB22A do tomateiro cv. 'Híbrido Chapolin' terem a zona de inibição do diâmetro fúngico igual a 29,8 e 30,7%, respectivamente, sendo a cultivar com pior desempenho em relação às variáveis analisadas, quando comparadas às demais cultivares avaliadas neste trabalho, apresentou uma porcentagem de inibição relativamente alta em apenas cinco dias, quando em confronto com os resultados apresentados por Brito et al. (2018).

Em relação à inibição do crescimento do fungo fitopatogênico *Alternaria* sp. (ALT23) na presença de bactérias endofíticas (Tabela 4; Figura 5), os isolados RB12, RB13, RB14 e RB15T apresentaram inibição do diâmetro micelial superior a 40% e tiveram potencial de inibição classificado como forte, uma vez que apresentaram redução visível do crescimento típico do fungo em relação à testemunha dentro do período de tempo avaliado. Entretanto, os isolados RB12 e RB15T sofreram inibição do crescimento da colônia bacteriana endofítica pela presença do inóculo fúngico em quase todas as repetições, de forma que a *Alternaria* passou a crescer por cima da bactéria.

Tabela 4. Inibição do crescimento do fungo fitopatogênico *Alternaria* sp. (ALT23) na presença de bactérias endofíticas selecionadas de cultivares de tomateiro cv. ‘Cereja’ (CB2, CB3, CB5 e CB6), cv. ‘Rasteiro Rio Grande’ (RB9A, RB10T, RB12, RB13, RB14 e RB15T) e cv. ‘Híbrido Chapolin’ (HB19A e HB22A)

Isolado	IN-ALT*	Odor
	5 ^a dia	5 ^o dia
CB2	Muito Forte	Forte
CB3	Muito Forte	Forte
CB5	Muito Forte	Forte
CB6	Muito Forte	Forte
RB9A	Muito Forte	Forte
RB10T	Muito Forte	Forte
RB12	Forte	Forte
RB13	Forte	Ausente
RB14	Forte	Ausente
RB15T	Forte	Suave
HB19A	Moderado	Ausente
HB22A	Moderado	Ausente

*IN-ALT: “moderado” = inibição do crescimento micelial inferior a 40%; “forte” = inibição do crescimento micelial superior a 40% e inferior a 45%; “muito Forte” = inibição do crescimento micelial superior a 45%.

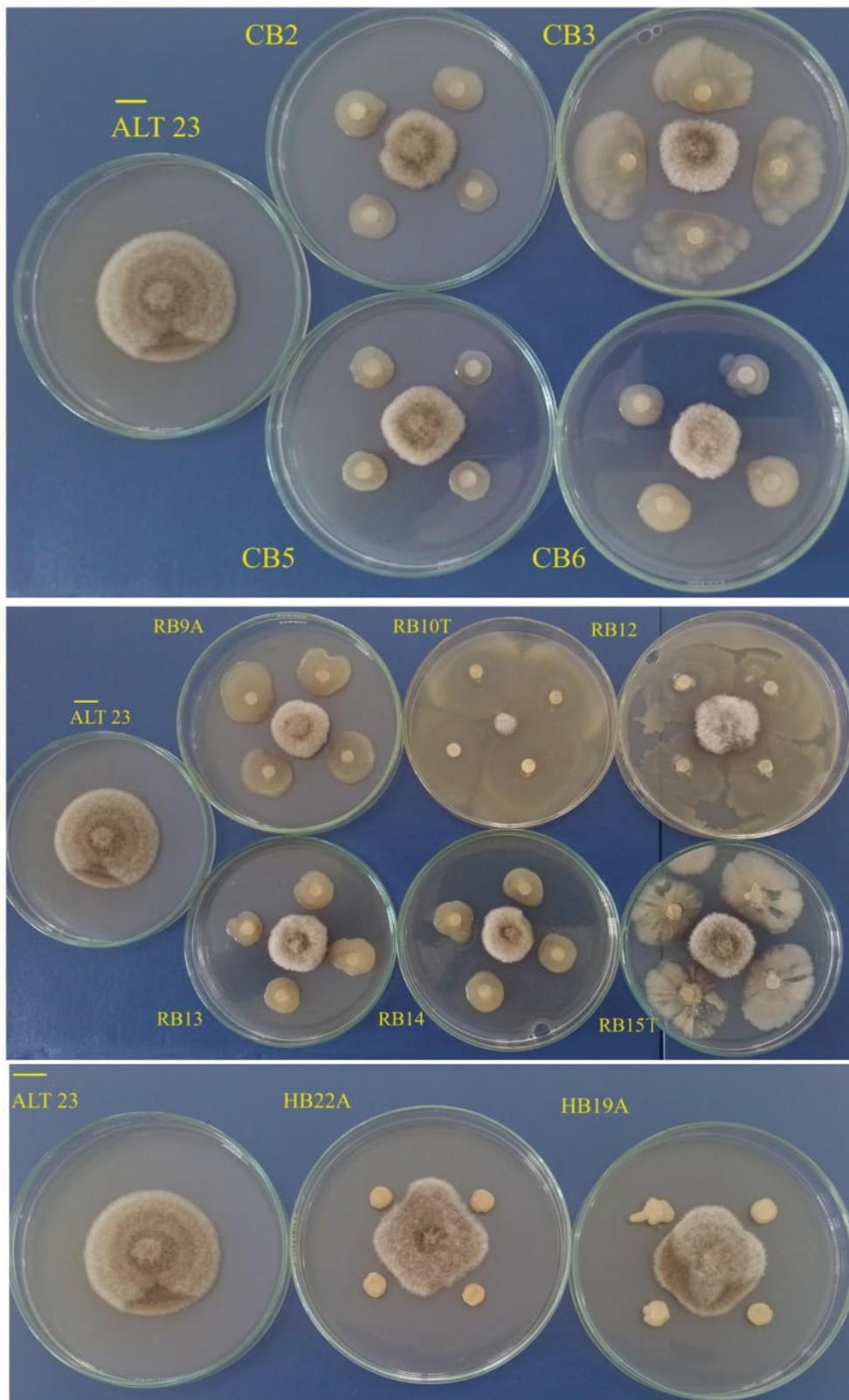


Figura 5. Crescimento micelial do fungo fitopatogênico *Alternaria* sp. (ALT23) na presença dos isolados bacterianos endofíticos obtidos a partir de plântulas de cultivares do tomateiro cv. 'Cereja' (CB2 a CB6), cv. 'Híbrido Chapolin' (H19A e HB22A) e cv. 'Rasteiro Rio Grande' (RB9A, RB10T, RB12, RB13, RB14 e RB15T), após cinco dias de cultivo (Barra = 1 cm)

Todos os tratamentos da cultivar Cereja (CB2, CB3, CB5 e CB6) foram classificados com potencial de inibição da *Alternaria* sp. (ALT23) como “Muito Forte”, ainda que não tenham sido encontradas evidências na literatura da resistência da cultivar do tomateiro cereja a presença de patógenos do gênero *Alternaria*. Os isolados RB9A e RB10T também foram classificados com potencial de inibição “Muito Forte” em relação ao fitopatógeno (Tabela 4, Figura 5). Nenhum desses tratamentos sofreu interferência no crescimento de suas colônias bacterianas pela presença do fungo de *Alternaria*.

Todos os fungos caracterizados em IN-ALT como “Muito Forte”, apresentaram odor “Forte” (Tabela 4) conforme avaliação subjetiva. Portanto, é possível que exista uma relação entre o odor determinado forte e o potencial antagonista das bactérias endofíticas, uma vez que os mecanismos de ação desses micro-organismos quanto ao controle de fitopatógenos envolve a síntese e liberação de compostos voláteis tais como: fenóis, quinonas e alcalóide (Morales-Cadeño et al., 2021). Bactérias do gênero *Bacillus* spp. tiveram sua atividade antagonista comprovada por meio da indução de resistência das plantas e pela produção de compostos voláteis (Souza, 2018). Portanto, é possível que a presença do odor forte seja um indicador da produção de compostos voláteis pelas bactérias, utilizados como mecanismo de ação para a inibição do fungo *Alternaria* sp. (ALT23).

CONCLUSÕES

Por meio do presente estudo foi possível constatar que as bactérias endofíticas obtidas a partir de plântulas de tomateiro cv. ‘Cereja’, cv. ‘Rasteiro Rio Grande’ e cv. ‘Híbrido Chapolin’ são capazes de promover “in vitro” a inibição do crescimento fitopatogênico de *Alternaria* sp. (ALT23) obtido do tomate.

Os isolados bacterianos CB3 (*Bacillus siamensis* KCTC 13613) e RB10T (*Bacillus velezensis* CR-502) tiveram ótimo desempenho quanto à inibição do crescimento micelial e redução significativa da velocidade de crescimento do fungo de *Alternaria* em relação à testemunha.

A cultivar de tomateiro Cereja se destacou por obter o maior número de isolados com elevado potencial antagonista ao crescimento fúngico da *Alternaria*.

As bactérias endofíticas possuem grande potencial a ser explorado em campo para atuar de forma sustentável como controle biológico de doenças causadas pelo fungo fitopatogênico *Alternaria* sp. na cultura do tomate, e podem ser usadas para reduzir danos ao meio ambiente e aos seres humanos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, P. P. S. de; BAPTISTA, J. P.; HIGASHI, A. Y.; TEIXEIRA, G. M.; ALMEIDA, L. H. C. de; OLIVEIRA JUNIOR, A. G. de; BALBI-PEÑA, M. I. Controle in vitro de fungos fitopatogênicos e tombamento de tomate por *Bacillus velezensis* LABIM40 (CMRP 4489). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 44, n. 3, p. 1077-1096, maio/jun. 2023. Disponível em: <[DOI:10.5433/1679-0359.2023v44n3p1077](https://doi.org/10.5433/1679-0359.2023v44n3p1077)>. Acesso em: 20 out. 2023.

AZEVEDO, J. L. **Microrganismos endofíticos**. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.) Ecologia microbiana. Jaguariúna: EMBRAPA, 1998. p. 117-137. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/13052/1/Melo-ecologia.pdf>>. Acesso em: 07 out. 2023.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 4a. ed. Ohio: Amer Phytopathological Society. 1998. 234p.

BRITO, T. S.; LIMA, W. F. de; PAN, R.; PORFIRIO, M. D.; CANELLO, K. T.; CHAVES, E. I. D. Antagonismo de bactérias diazotróficas isoladas de plantas de milho no biocontrole de fitopatógenos. **Cultivando o Saber**, Toledo, v. 11, n. 1, p. 78-88, jan./mar. 2018. Disponível em: <https://cultivandosaber.fag.edu.br/index.php/cultivando/article/download/851/778/>>. Acesso em: 20 out. 2023.

GRAF, A. L; FONTOURA, S. B.; ANDRADE, G. C.; COSTA, J. S.; ITAKO, A. T.; SOLDI, C. Óleo essencial de folhas de cataia (*Drimys brasiliensis*) no crescimento micelial de *Alternaria porri*. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, s.l., v. 3, pág. 245–252, jul. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.18378/rvads.v16i3.8638>>. Acesso em: 13 set . 2023.

HAZARIKA, D. J.; GOSWAMI, G.; GAUTOM, T.; PARVEEN, A.; DAS, P.; BAROOAH, M.; BORO, R. C. Lipopeptide mediated biocontrol activity of endophytic *Bacillus subtilis* against fungal phytopathogens. **BMC Microbiology**, s.l., v.19, 71, p.1-13, abr. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12866-019-1440-8>>. Acesso em: 13 set . 2023.

Isla Sementes. 2023. Disponível em: <<https://www.isla.com.br/>>. Acesso em: 1 out. 2023.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10a . ed. Prentice-Hall Inc., 2004. 608 p.

MENTEN, J. O. M.; MACHADO, J. C.; SIQUEIRA, C. S. Perdas associadas a sementes. **Revista Cultivar**, *s.l.*, v.282, p.09-12, nov. 2022. Disponível em: <https://issuu.com/grupocultivar/docs/cultivar_282_site>. Acesso em: 08 out. 2023.

MIRANDA, F. R.; MESQUITA, A. L. M.; MAIA, C. W. C. P.; SOARES, J. V. S.; SILVA, J. G. S. Cultivo protegido de tomate cereja, em substrato, na região da Ibiapaba, Ceará. Fortaleza, CE: **Embrapa**. v. 51, p. 1-22, jun/2023. [Circular Técnica] Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1154534/1/Ci-51-1.pdf>>. Acesso em: 1 out . 2023.

KRZYZANOWSKI, F. C.; DIAS, D. C. F. S.; FRANÇA-NETO, J.. B. Deterioração e vigor da semente. Londrina, PR: **Embrapa**. v. 191, p. 1-19, dez/2022. [Circular Técnica] Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/doc/1151118/1/Circ-Tec-191.pdf>>. Acesso em: 1 out . 2023.

MORALES-CEDENO, L. R.; OROZCO-MOSQUEDA, M. D. C.; LOEZA-LARA, P. D.; PARRA-COTA, F. I.; DE LOS SANTOS-VILLALOBOS, S.; SANTOYO, G. Plant growth-promoting bacterial endophytes as biocontrol agents of pre- and post-harvest diseases: Fundamentals, methods of application and future perspectives. **Microbiological Research**, *s.l.*, v.242, 126612, p.1-12, set. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126612>>. Acesso em: 13 set . 2023.

MOURA, Q. A. **Formulações à base de *Bacillus* spp. para controle de *Alternaria alternata* f.sp. *citri***. 2023. 68p. Tese (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, Araras. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/12878/MOURA_%C3%81lissou_2020.pdf?sequenc e=4&isAllowed=y>. Acesso em: 13 set . 2023.

SHARMA, A.; KAUSHIK, N.; BAJAJ, A.; RASANE, M.; SHOUCHE, Y. S.; MARZOUK, T.; DJEBALI, N. Screening of tomato seed bacterial endophytes for antifungal activity reveals lipopeptide producing *Bacillus siamensis* strain NKIT9 as a potential bio-control agent. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v.12, 1228, p.1-17, jun. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.609482>>. Acesso em: 13 set . 2023.

SHARMA, I.; RAINA, A.; CHOUDHARY, M.; APRA; KAUL, S.; DHAR, M. K. Fungal endophyte bioinoculants as a green alternative towards sustainable agriculture. **Heliyon**, *s.l.*, v.9, n.9, e19487, p.1-17, set. 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e19487>>. Acesso em: 13 set . 2023.

SILVA, F.C. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2009. 627p.

SILVA, V. N.; ZAMBIASI, C. A.; TILLMANN, M. A. A.; MENEZES, N. L.; VILLELA, F. A. Condução do teste de condutividade elétrica utilizando partes de sementes de feijão. **Revista de Ciências Agrárias**, *s.l.*, v. 37, n. 2, p. 206-213, 2014. Disponível em: <[DOI: https://doi.org/10.19084/rca.16816](https://doi.org/10.19084/rca.16816)>. Acesso em: 13 set . 2023.

SOUZA, A. C. **Controle biológico de *Alternaria alternata*, agente causal da mancha marrom de alternaria, por *Bacillus spp.*** 2018. 79p. Tese (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, Araras. Disponível em: <<https://repositorio.ufscar.br/SOUZA>>. Acesso em: 1 out . 2023.

TEIXEIRA, F. M. V. Cultivos: Tomate - Produção - Doenças e pragas. **Embrapa Hortaliças**, 2022. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/tomate/doencas-e-pragas>>. Acesso em: 1 set. 2023.

TÖFOLI, J. G.; DOMINGUES, R. J. **Doenças fúngicas**. In: BRANDÃO FILHO, J. U. T.; FREITAS, P. S. L.; BERIAN, L. O. S.; GOTO, R., Comps. Hortaliças-fruto [online]. Maringá: EDUEM, 2018, p.271-313. Disponível em: <<https://doi.org/10.7476/9786586383010.0010>>. Acesso em: 2 out. 2023.