ATENUAÇÃO DE SINTOMAS DA MANCHA BACTERIANA (*XANTHOMONAS EUVESICATORIA*) EM TOMATEIRO TRATADO COM BIOFERTILIZANTES

AMINTHIA POMBO SUDRÉ DA SILVA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

DEZEMBRO DE 2015

ATENUAÇÃO DE SINTOMAS DA MANCHA BACTERIANA (*XANTHOMONAS EUVESICATORIA*) EM TOMATEIRO TRATADO COM BIOFERTILIZANTES

AMINTHIA POMBO SUDRÉ DA SILVA

"Monografia apresentada ao Centro de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Licenciada em Química."

Orientador: Prof. Luciano Pasqualoto Canellas

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

DEZEMBRO DE 2015

ATENUAÇÃO DE SINTOMAS DA MANCHA BACTERIANA (*XANTHOMONAS EUVESICATORIA*) EM TOMATEIRO TRATADO COM BIOFERTILIZANTES

AMINTHIA POMBO SUDRÉ DA SILVA

"Monografia apresentada ao Centro de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Licenciada em Química."

Aprovada em 17 de dezembro de 2015

Comissão examinadora:

_____

Prof. Fábio Lopes Olivares (Ph.D., Microbiologia do Solo) – UENF

_____

Profa. Camila Ramos de Oliveira Nunes (M.Sc., Ciências Naturais) – IFF Campus Itaperuna

_____

Prof. Luciano Pasqualoto Canellas (Ph.D., Ciência do Solo) – UENF (Orientador)

Dedico esta monografia à minha família, principalmente à minha mãe pelo carinho e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado força, persistência e saúde para chegar até aqui.

A minha mãe por ter vivido a minha alegria e tristeza nesses anos, me apoiando e me orientando na vida com todo amor.

A minha família, por me ensinar a ter força, garra, persistência e recarregar minhas energias quando estamos juntos.

Ao meu orientador, Luciano Canellas, pela orientação muitas vezes além do profissional, pelas oportunidades que foram me dadas dentro do NUDIBA e pelo conhecimento partilhado.

A Lídia, por ter me acompanhado na análise de proteínas e toda paciência comigo.

Aos colegas do NUDIBA, Silézio, Keiji, Pollyana, Lívia, Jucimara, Kamilla, Lívia Marcon, Isaac, Mariana, Régis e Natália, pelas trocas de conhecimento e todo apoio físico e emocional.

Aos colegas de turma Fernanda, Nathanny, Suzana, Isaac, Arthur, Mariana, Larissa Alves, Laysa, Sthefanny, Larissa Manhães pela amizade, incentivo e apoio mútuo nas aulas e atividades do curso de licenciatura em química.

Aos professores, pelo conhecimento compartilhado e incentivo para chegar até aqui.

A todas as pessoas que contribuíram de forma direta ou indireta para que atingisse esse objetivo.

SUMÁRIO

Resumo..... 7
1. Introdução..... 9
1.1. Mancha bacteriana..... 11
1.2. Biofertilizantes..... 12
1.3. Ácidos orgânicos..... 13
2. Objetivo..... 15
3. Material e Métodos..... 15
3.1. Cultivo das plantas..... 15
3.2. Obtenção dos inóculos bacterianos..... 16
3.2.1. *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC 54..... 16
3.2.2. *Xanthomonas euvesicatoria* T_1P_3..... 16
3.3. Obtenção dos ácidos húmicos..... 17
3.3.1. Extração dos ácidos húmicos..... 17
3.3.2. Determinação de C e N nos ácidos húmicos..... 17
3.4. Avaliação da resistência à mancha bacteriana..... 18
3.5. Identificação e quantificação dos ácidos orgânicos em CLAE..... 20
4. Resultados e discussão..... 21
4.1. Teor de C e N nos ácidos húmicos utilizados..... 21
4.2. Avaliação da presença de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC 54 no substrato inoculado..... 21
4.3. Inoculação com *Xanthomonas euvesicatoria* T_1P_3..... 22
4.4. Biomassa de tomate ‘Micro-Tom’..... 22
4.5. Avaliação da resistência à mancha bacteriana..... 26
4.6. Identificação e quantificação dos ácidos orgânicos em CLAE..... 28
5. Conclusões..... 33
Referências bibliográficas..... 34

RESUMO

Silva, Aminthia Pombo Sudré da. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Dezembro de 2015. Atenuação de sintomas da mancha bacteriana (*Xanthomonas euvesicatoria*) em tomateiro tratado com biofertilizantes. Orientador: Prof. Luciano Pasqualoto Canellas.

A mancha bacteriana em tomateiro, causada por *Xanthomonas* spp., é uma das principais doenças que atinge esta cultura. Devido à falta de controle eficiente muitos produtores fazem aplicações inadequadas de agrotóxicos. Os biofertilizantes podem auxiliar na expressão da resistência sistêmica que pode ser adquirida ou induzida. O objetivo desse trabalho foi avaliar a atenuação de sintomas da mancha bacteriana (*Xanthomonas euvesicatoria*) em tomateiro tratado com biofertilizantes. Foi utilizada a cultivar 'Micro-Tom' plantada em vasos de 3 L em casa de vegetação. Os tratamentos foram aplicados no substrato de crescimento após um dia do transplante: ácidos húmicos (AH), bactéria promotora de crescimento – *Herbaspirillum seropedicae* (BAC) e aplicação conjunta de ambos (AH + BAC). O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, em esquema fatorial 4 x 2 que constituiu nos quatro tratamentos descritos acima com e sem inoculação de *X. euvesicatoria* na parte aérea, três repetições e uma planta por parcela, totalizando 24 plantas. Foram analisadas a virulência do isolado *X. euvesicatoria* e a população bacteriana de *H. seropedicae* no substrato de crescimento das plantas. A virulência foi avaliada pela medida da área abaixo da curva de progresso da doença com base em notas de severidade e incidência da doença. Além disso, foram quantificados os teores dos ácidos oxálico, cítrico e succínico em extratos da parte aérea por CLAE a fim de estudar a relação destes ácidos com a possível indução de resistência. O isolado do patógeno causou sintomas típicos da mancha bacteriana. A aplicação de AH e BAC isoladamente e em combinação no solo atenuou significativamente os sintomas da mancha bacteriana. O tratamento AH se destacou pela

menor área abaixo da curva de progresso da doença no último dia de avaliação, menor incidência e severidade da doença. As plantas infectadas por *X. euvesicatoria* apresentaram maior concentração dos ácidos cítrico e oxálico enquanto que o tratamento AH + BAC com *X. euvesicatoria* induziu ao aumento da concentração de ácido succínico. Os AH e a bactéria *H. seropedicae* atenuaram a sintomatologia da mancha bacteriana causada por *X. euvesicatoria.*

1. INTRODUÇÃO

O Brasil está entre os principais produtores de hortaliças devido a sua extensão territorial e a disponibilidade de mão de obra. É o país que mais utiliza agrotóxicos no mundo. Dentre as principais hortaliças produzidas no país, o tomate (*Solanum lycopersicum*) vem se destacando ao longo dos anos. Em 2013 ultrapassou a produção de quatro milhões de toneladas com produtividade média de 67 toneladas/ha e área plantada de 67 mil ha (FAOSTAT, 2015). Os principais estados produtores são: São Paulo, Pernambuco, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Bahia, Espirito Santo, Goiás, Paraíba, Santa Catarina, Paraná e Ceará.

A cultura do tomateiro é uma das olerícolas mais acometidas por doenças, demandando uma quantidade elevada de agrotóxicos (tetradifona, tiabendazol, tiacloprido, tiametoxam, acetamiprido, acibenzolar-S-metilico, abamectina, azoxistrobina, benalaxil, beta-ciflutrina, beta-cipermetrina, bifentrina, boscalida, cúpricos, entre outros) (ANVISA, 2015). Além dos produtos registrados para a cultura, também são aplicados produtos não registrados e em quantidade acima da recomendada. Segundo o relatório da Anvisa de 2012 para a cultura do tomate, pelo sistema PARA – Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos - 16% das amostras de tomate foram consideradas insatisfatórias devido à ingredientes ativos não autorizados (NA); ingredientes ativos autorizados, mas acima dos limites máximos autorizados (>LMR); e ambos NA e >LMR (ANVISA, 2015).

O menor número de princípios ativos registrados para controle de doenças bacterianas é responsável pela maioria dos agrotóxicos aplicados indevidamente. Em tomate destaca-se a mancha bacteriana causada por quatro espécies de *Xanthomonas* com predomínio no Brasil da *X. euvesicatoria.* A mancha bacteriana provoca perda na produtividade e qualidade dos frutos devido ao amarelecimento das folhas, seguida de desfolha, diminuindo a área fotossintética e expondo os frutos ao sol, podendo causar escaldadura nos frutos. É uma doença importante pela dificuldade de controle, sendo essencial o uso de práticas preventivas, tais como, uso de sementes sadias, eliminação de restos culturais, rotação de culturas, entre outras. Segundo a página eletrônica do Agrofit (Sistema de agrotóxicos fitossanitários do MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento)

são recomendados para o controle desta doença agrotóxicos de formulação cúprica, famoxadona, mancozebe, cimoxanil e cloreto de benzalcônio. No entanto, muitos isolados são resistentes a esses produtos (HIBBERD et al., 1988; QUEZADO-DUVAL, 2003) dificultando o controle desta doença. Além destes princípios ativos também é recomendado o uso do bioestimulante acilbenzolar-S-metílico (AGROFIT, 2015) que não age diretamente sobre o patógeno, mas ativa os mecanismos de defesa natural das plantas, aumentando sua resistência de acordo com o fabricante (ADAPAR, 2015).

Existem dois tipos de resistência sistêmica: a induzida (RSI) e a adquirida (RSA). Estas diferem quanto ao mecanismo de indução, no entanto a expressão da resistência é semelhante, pois não é restrita ao sítio de indução, podendo ser ativada na raiz e expressada na folha, por exemplo. A RSA considera o acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese (PRPs) como mecanismo induzido de defesa da planta. Fenotipicamente, a RSA pode alterar visualmente a planta com necroses, manchas, entre outros. Além disso, as rotas de sinalização são dependentes do salicilato. Já a RSI geralmente não está envolvida com o acúmulo de PRPs, apresenta outras rotas de sinalização que podem ser dos jasmonatos e etileno, e não apresenta alterações na planta (VAN LOON et al., 1997; PIETERSE et al., 1998; VAN LOON et al. 1998). A RSA é ativada por microrganismos não patogênicos, patógenos virulentos e avirulentos, e indutores químicos. Já o elicitor da RSI, segundo Kloepper et al. (1992), é específico, sendo somente microrganismos não patogênicos. No entanto, Métraux (2001) associa o termo induzido quando emprega-se agentes benéficos, simbiontes ou abiótico.

O tempo de resistência por ambos mecanismos, RSA e RSI, é variável. Schons et al. (2011) estudando a durabilidade da resistência induzida por ulvana, algas marinhas do gênero *Ulva*, à antracnose em feijoeiro, concluiu que duas aplicações foram suficientes e que a resistência durou nove dias após aplicação do tratamento. Teixeira et al. (2005) avaliaram a resistência sistêmica induzida mediada por 10 rizobactérias promotoras de enraizamento em eucalipto quanto a resistência à ferrugem e observaram que o tratamento do substrato no preparo das mudas (80 dias) foi mais eficiente que mudas tratadas uma semana antes da inoculação do patógeno.

Quanto aos fatores bióticos que induzem resistência, um exemplo clássico é a utilização de bactérias fluorescentes (*Pseudomonas* spp.) que atuam tanto como bactérias promotoras do crescimento, antagonistas de patógenos do solo e ativadoras de RSI reduzindo a severidade de doenças na parte aérea para várias espécies de plantas e também na inibição do crescimento desses sintomas (PIETERSE et al., 2005) e diversos patógenos. (RAAIJMAKERS e WELLER, 1998).

Os biofertilizantes líquidos também são indutores, com grande potencial para atuar como elicitores de RSI. Devido à grande biodiversidade de microrganismos nos biofertilizantes, alguns podem apresentar bioatividade elevada e levar a indução de mecanismos de RSA e RSI, mediado pelos estímulos ou sinais químicos presentes nos biofertilizantes e recebidos pelos sítios fitoreceptores, induzindo reações de defesa em tecidos vegetais distantes em relação ao local de aplicação (BARBOSA e MEDEIROS, 2007).

1.1. Mancha bacteriana

A mancha bacteriana é uma doença causada por espécies do gênero *Xanthomonas*. Bactérias deste gênero se caracterizam por serem gram negativas e apresentarem colônias bacterianas de coloração amarelada (RYAN et al., 2011). Jones et al. (2004) reclassificaram por meio da hibridização DNA:DNA a *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* para *X. euvesicatoria*. Esta espécie causa pústulas seguidas de manchas amareladas nas folhas, principalmente nos bordos, devido à presença de hidatódios que são aberturas permanentes responsáveis pela exsudação de solutos orgânicos, enzimas, vitaminas, agentes redutores e oxidantes, substâncias promotoras do crescimento como auxina, giberelina, citocinina, ácido abscísico e estão localizados nas extremidades das folhas (SINGH, 2014).

A bactéria *X. euvesicatoria* causa a mancha bacteriana em plantas hospedeiras de pimenta (*Capsicum* spp.) e tomate (RYAN et al., 2011), proporcionando muitos danos a essas culturas com perda da qualidade de frutos e de produtividade, principalmente em regiões úmidas (JUHÁSZ et al., 2006).

1.2. Biofertilizantes

Segundo o Decreto n° 4954 de 2004, referente ao regulamento da Lei n°6894, o termo biofertilizante significa "*produto que contém princípio ativo ou agente orgânico, isento de substâncias agrotóxicas, capaz de atuar, direta ou indiretamente, sobre o todo ou parte das plantas cultivadas, elevando a sua produtividade, sem ter em conta o seu valor hormonal ou estimulante*" (BRASIL, 2004). A EBIC (*European Biostimulants Industry Council*), o Conselho Europeu da Indústria de Bioestimulantes também considera bioestimulantes: biofertilizantes e promotores de crescimento de rizobactérias, além de extratos de algas, inoculantes microbianos, aminoácidos, ácidos húmicos e fúlvicos e compostos baseados em glucosamina.

Os biofertilizantes à base de substâncias húmicas (SH) e bactérias promotoras do crescimento vegetal podem ser usados como bioestimulantes do crescimento. Patten & Glick (2002) consideram que rotas biossintéticas distintas de AIA (Ácido indol acético) são produzidas por bactérias benéficas e patogênicas. As SH induzem a atividade da fenilalanina amônia liase aumentando a concentração de compostos fenólicos nos tecidos (SCHIAVON et al., 2010 & ERTANI et al., 2011). Foi observado previamente que o uso em conjunto de SH e *Herbaspirillum seropedicae* diminuiu o nível de infestação de *Phytophtora infestans* em tomateiro (OLIVARES et al., 2015). Demir et al. (2015) estudaram os efeitos de fungo micorrízico, ácidos húmicos (500 ppm) e soro de leite em plantas de tomate, pimentão e berinjela inoculadas com *Verticillium dahliae* Kleb. (V.d.), agente causal da murcha por verticílio. Os autores observam em tomate que os tratamentos que continham AH resultaram em menor incidência de murcha (cerca de 13% menor) e menor porcentagem de escurecimento vascular (34%).

Além disso, SH aumentaram a exsudação de alguns ácidos orgânicos (CANELLAS et al., 2008; PUGLISI et al., 2008; 2009; 2013). Tanto os compostos fenólicos como os ácidos orgânicos podem estar envolvidos na redução da severidade de sintomas da *Xanthomonas*. Cavalcanti et al. (2006) estudaram a ação do acilbenzolar-S-metil e Ecolife®. Este, segundo o fabricante, corresponde a uma "biomassa cítrica": mistura de bioflavanoides, fitoalexinas, polifenóis, glicerina vegetal, ácidos ascórbico, lático e cítrico.

Ambos foram eficientes na redução em 49 % e 31 %, respectivamente, da severidade da mancha bacteriana em tomateiro.

1.3. Ácidos orgânicos – AO

As plantas contêm muitos ácidos orgânicos, como os ácidos oxálico, succínico, fumárico, málico, cítrico, entre outros. Estes variam de acordo com a cadeia carbônica (JONES, 1998). O teor de ácido orgânico em plantas é governado pelo tipo de fixação de carbono, idade e *status* nutricional. O grau de desbalanceamento de cargas determina os níveis de ácidos orgânicos nas raízes e quando há uma absorção excessiva de cátions são requeridas cargas negativas, geralmente fornecidas por ácidos orgânicos, como o malato e citrato (CHANG; ROBERTS, 1991).

Alguns destes ácidos orgânicos estão envolvidos na produção de energia como intermediários do ciclo do ácido cítrico (ex.: citrato, malato, succinato), outros estão primariamente na célula para a manutenção do potencial osmótico ou balanceamento de cargas catiônicas como o malato e o oxalato (JONES, 1998), alguns estão envolvidos na sinalização, como o ácido málico (RUDRAPPA et al., 2008), e também há ácidos orgânicos ou seus derivados envolvidos na resistência a estresses abióticos (MA et al., 2001) e bióticos (KIM et al., 2008). A associação entre ácidos orgânicos e seus derivados e a proteção e/ou resistência a certos fitopatógenos já foi estudada para alguns patossistemas.

Em 1980, Noyes e Hancock estudando o patossistema girassol x *Sclerotinia sclerotiorum* detectaram teores de até 15 vezes mais ácido oxálico em folhas murchas de plantas infectadas. E ao inocularem ácido oxálico no hipocótilo, demonstraram que o ácido se move sistemicamente até a folha, acumulando a um nível crítico que leva a murcha, seguida de morte. Sintomas estes similares aos de plantas infectadas pelo fungo. Assim, os autores concluem que o ácido oxálico age como uma toxina móvel causando a síndrome da murcha. E as cultivares de girassol mais resistentes tiveram maior tolerância ao ácido oxálico.

A degradação do ácido oxálico em plantas cultivadas pode reduzir o estresse nutricional e conferir resistência a fungos. O ácido oxálico é catalisado por duas rotas principais, a descarboxilação e oxidação. A primeira ocorre pela

ação da oxalil-CoA descarboxilase ou pela enzima oxalato descarboxilase que vai ativar para CO_2 e ácido fórmico. Já a oxidação tem sido detectada em plantas onde o ácido é quebrado para CO_2 e H_2O_2. Com base nessas informações Kesarwani et al. (2000) clonaram o gene da oxalato descarboxilase e obtiveram plantas transgênicas de tabaco e tomate que ao serem confrontadas com *S. sclerotiorum* expressaram elevada resistência a este patógeno.

Kim et al. (2008) relatam que o ácido oxálico induz a morte celular programada, esta pode ser benéfica a fungos necrotróficos, ou seja, que dependem de tecidos mortos para sobreviver, como *S. sclerotiorum*. Entretanto, este evento também pode ser benéfico à planta, quando se trata de patógenos não necrotróficos, como no caso da reação de hipersensibilidade.

A morte celular programada está normalmente relacionada à reprodução, germinação de sementes, formação de aerênquima, diferenciação celular e senescência (KIM et al., 2008). Além da morte celular programada, há interferência do ácido oxálico no funcionamento das células guardas, nas quais o oxalato age via acúmulo de moléculas ativa osmoticamente induzindo a abertura dos estômatos e inibindo o fechamento dos estômatos estimulado pelo ácido abscísico (GUIMARÃES; STOTZ, 2004).

Zhu et al. (2016) citam trabalhos com a aplicação pós-colheita do ácido oxálico como elicitor da resistência sistêmica induzida contra doenças causadas por fungos, bactérias e vírus durante o armazenamento. Estes autores testaram a aplicação pré-colheita em kiwi (5 mmol/L ácido oxálico) em três épocas após a floração, na época adequada colheram os frutos na maturidade comercial (10 % de sólidos solúveis totais) e detectaram que os tratamentos com ácido oxálico tiveram frutos com maior teor de ácido ascórbico, abrandou a diminuição da firmeza dos frutos e do ácido cítrico, aumentou o teor de sólidos solúveis e causou um decréscimo de doenças naturais. Ao inocular *Penicillium expansum* pós-colheita em frutos tratados houve uma redução da doença e da toxina patulina produzida por este fungo.

Cohen (1993) estudou o efeito da aplicação exógena de três isômeros do ácido beta aminobutírico, um aminoácido derivado da descarboxilação do glutamato, em tomateiro inoculado com *Phytophthora infestans.* O autor concluiu que o ácido DL-3-aminobutírico controlou 84% a murcha por fitóftora

em relação aos demais isômeros, por resistência sistêmica induzida, esta foi comprovada pela proteção de 75-95% nas folhas tratadas e de 60 a 100% em folhas superiores não tratadas.

Montoyama et al. (2003) tiveram como objetivo estudar o potencial de um extrato cítrico (produto comercial Ecolife 40) na atividade antibacteriana. O produto foi testado nas concentrações de 1, 10, 100, 1000 e 5000 ppm sobre as bactérias *Ralstonia solanacearum* e *X. axonopodis* pv. *manihotis* avaliando-se halo de inibição, densidade óptica e número de unidades formadoras de colônias. Atravésdos resultados obtidos verificou-se que o extrato cítrico apresentou atividade antibacterianasendo dose-dependente. A concentração de 5000 ppm foi a mais eficiente. Dessa forma, pode sugerir que substâncias como flavonoides, ácidos ascórbico, cítrico e lático, encontrados no extrato cítrico podem influenciar no desenvolvimento das bactérias.

Garcia et al. (2014) avaliaram o efeito dos ácidos ascórbico, cítrico e lático e a mistura estável dos mesmos sobre a murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) e detectaram que os ácidos orgânicos isolados aplicados na forma direta, imergindo as raízes nas soluções, controlaram 100% da doença em pimentão e a única diferença com ao mistura dos ácidos foi o período de incubação que neste foi maior. E quando pulverizados nas folhas reduziram a AACPD - Área abaixo da curva de progresso da doença em 46% e aumentaram o período de incubação, indicando a resistência sistêmica induzida, pois a *Ralstonia* é uma bactéria de solo.

2. OBJETIVO

Avaliar o efeito de ácidos húmicos e bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) sobre a diminuição da severidade dos sintomas da mancha bacteriana em folhas de tomateiro.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cultivo das plantas

A semeadura do tomate ‘Micro-Tom’ (*Solanum lycopersicum* Mill.) foi realizada em bandejas de isopor (poliestireno) de 128 células com substrato

comercial Vivatto®, sendo irrigadas uma vez ao dia. Esta cultivar foi escolhida por ter um ciclo rápido ± 2,5 meses e ter porte anão. Foram mantidas em câmara de crescimento a 28ºC e 80 % UR com fotoperíodo de 16 h para o dia e 8 h para a noite. Depois de 35 dias as plântulas foram transplantadas para vasos de 3L em casa de vegetação contendo areia : vermiculita na proporção de 2 : 1, essa mistura foi autoclavada três vezes a 121°C, 1 atm por uma hora.

3.2. Obtenção dos inóculos bacterianos

3.2.1. *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC 54

O inóculo da bactéria *H. seropedicae*, estirpe HRC 54, foi obtido no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (LBCT/UENF). As bactérias foram crescidas em meio líquido DYGS (*Dextrose Yeast Glucose Sucrose*) sob rotação de 120 rpm a 30ºC por 24 h. A suspensão bacteriana foi ajustada para 10^9 células por mL (DÖBEREINER et al., 1995).

Para avaliar a sobrevivência da população bacteriana (*H. seropedicae*) no substrato foram amostradas em duas épocas (cinco e 16 dias) após a aplicação dos tratamentos. Coletou-se amostras do substrato de dois vasos por tratamento. A contagem bacteriana foi realizada por meio de diluição seriada em solução salina de 10^{-1} a 10^{-7}, onde colocou-se 10 µL de cada diluição na placa, para observar as colônias e contá-las. Para cada diluição foram inoculadas duas placas com meio DYGS e colocadas em BOD a 28°C. A contagem foi realizada 24 h após a inoculação.

3.2.2. *Xanthomonas euvesicatoria* T_1P_3

A suspensão de *X. euvesicatoria* foi preparada a partir do isolado ENA 4135, cedido pelo Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Este isolado foi selecionado pela sua patogenicidade, que foi previamente testada (JUHÁSZ, 2002; RIVA, 2002) e por ser resistente a defensivos à base de cobre (AGUIAR et al., 2000). O isolado foi cultivado em meio líquido DYGS (RODRIGUES NETO et al., 1986), por aproximadamente 36 h, sob agitação (100 rpm) a 28°C. Em seguida, as bactérias foram cultivadas em placas de Petri contendo o meio DYGS sólido. Após um período

de 36 h de crescimento, a 28 °C (CARMO et al., 1996), as colônias bacterianas foram suspensas em água estéril e a concentração de células foi ajustada para 10^8 UFC/mL, em espectrofotômetro marca Biospectro SP 220, utilizando-se absorbância de 0,300 e comprimento de onda de 600 nm (COSTA, 2000).

3.3. Obtenção do ácidos húmicos

3.3.1. Extração dos ácidos húmicos

As substâncias húmicas (SH) foram extraídas de vermicomposto produzido a partir de torta de filtro proveniente da usina de cana-de-açúcar (Coagro, Campos dos Goytacazes). A extração das SH solúveis do vermicomposto foi realizada com NaOH 0,1 mol.L^{-1} , na proporção: 1 g de vermicomposto : 10 mL de solução extratora em atmosfera inerte de N_2. Este procedimento foi repetido até que a coloração do extrato ficasse transparente, em média, após cinco extrações. Os ácidos húmicos (AH) foram obtidos com a acidificação da solução até aproximadamente pH 1,5 com HCl 6 mol L^{-1} . A redissolução (com NaOH 0,1 mol.L^{-1}) e precipitação (com HCl 6 mol.L^{-1}) foi repetida três vezes. Em seguida, foram adicionados 200 mL de solução aquosa diluída de HF e HCl (preparada com 5 mL de HCl 12 mol.L^{-1} e 5 mL de HF 48% v/v, sendo o volume da solução completado para 1 L com água deionizada). A amostra ficou sob agitação durante oito horas e os AH separados por centrifugação (15 min. a 5000 g). Os AH foram lavados com água deionizada até teste negativo contra cloreto utilizando-se $AgNO_3$, seguido por diálise contra água deionizada, utilizando uma membrana de 1000 Da. Antes da liofilização o pH foi ajustado a 7,00 com KOH 0,01 mol.L^{-1} (CANELLAS e SANTOS, 2005).

3.3.2. Determinação de C e N nos ácidos húmicos

O teor de C e N dos ácidos húmicos foi determinado em triplicata pelo método da combustão seca utilizando o analisador elementar Euro EA3000 (Eurovector 3000, Milão, Itália).

3.4. Avaliação da resistência à mancha bacteriana

O experimento de avaliação da resistência à mancha bacteriana foi conduzido em casa de vegetação na UAP/CCTA/UENF, no período de junho de 2015 a agosto de 2015. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, em esquema fatorial 4 x 2 utilizando quatro tratamentos no substrato ($CaCl_2$ 2 mmol/L– Controle; *H. seropedicae* 10^9 UFC/mL – BAC; Ácidos húmicos 4,5 mmol C/L (solução de $CaCl_2$ 2 mmol/L) – AH; *H. seropedicae* + Ácidos húmicos – AH + BAC), e dois tratamentos na parte aérea (sem e com inoculação de *X. euvesicatoria*), três repetições e uma planta por parcela, totalizando 24 plantas.

Um dia após o transplante, foram aplicados os tratamentos do substrato (Controle; AH; BAC; AH + BAC). Neste último os ácidos húmicos e a suspensão bacteriana foram preparados como descrito anteriormente separados, porém colocados na proporção de 4 AH : 1 BAC. Cada vaso recebeu 250 mL de tratamento (seis vasos por tratamento). As plantas foram irrigadas com água, porém dois dias na semana eram irrigadas com solução nutritiva de Clark, na qual na primeira semana foi com ¼ da força iônica (FI), na segunda semana com ½ de FI, na terceira ¾ de FI, e a partir da quarta semana 1 FI.

A inoculação da suspensão bacteriana de *X. euvesicatoria* ocorreu após 21 dias da aplicação dos tratamentos (15/07/15 - 56 dias após a semeadura). Aplicando em metade dos vasos de cada tratamento (três vasos) por pulverização nas folhas e os outros cinco vasos do tratamento também foram aplicados água por pulverização nas folhas, funcionando como um controle. Logo após a inoculação desta bactéria, realizou-se câmara úmida > 90% de UR com auxílio de sacos plásticos como demonstrado na Figura 1.

Após 72 horas de câmara úmida, os sacos foram retirados e começaram as observações dos sintomas da doença (severidade e número de folíolos infectados). As avaliações foram realizadas em dias alternados num total de sete avaliações de resistência à mancha bacteriana (*X. euvesicatoria* - *Xe*) com base em escala de severidade por meio de notas adaptada de Mello et al. (1997) (Figura 1).

Figura 1. Etapas da aplicação dos tratamentos (Controle, Ácidos húmicos - AH, *Herbaspirillum seropedicae* - BAC, AH + BAC), inoculação com *Xanthomonas euvesicatoria* e câmara úmida feita com sacos plásticos envolvendo toda a planta de tomate (*Solanum lycopersicum*) em casa de vegetação na UAP/CCTA/UENF.

A partir das notas de severidade e incidência (número de folíolos), foi calculada a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), na qual os dados obtidos foram integralizados e calculados por meio da fórmula: AACPD = $\sum [(y1+y2)/2]*(t2-t1)$, onde y1 e y2 que refere-se a duas avaliações sucessivas da intensidade da doença realizadas nos tempos t1 e t2, respectivamente (Campbell; Madden, 1990).

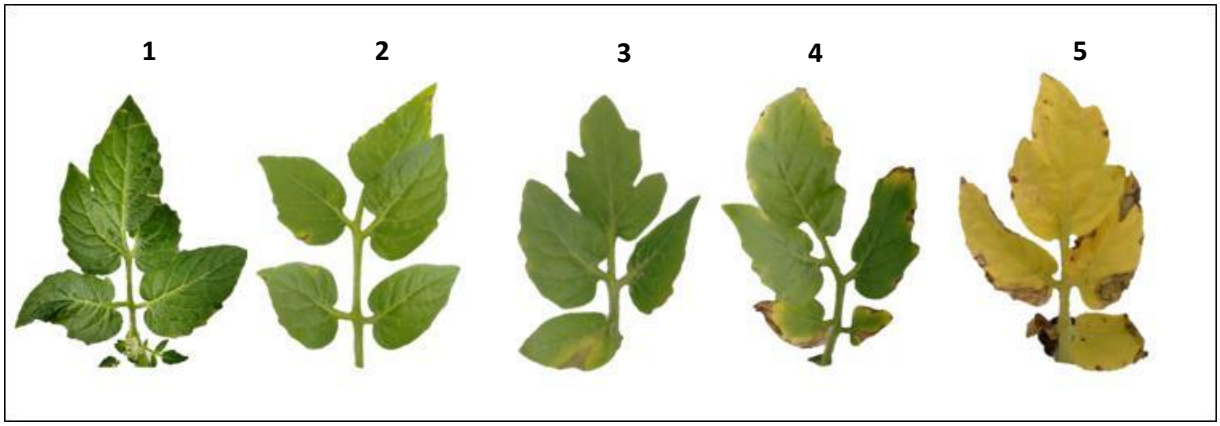

Figura 2. Escala de notas de severidade da mancha bacteriana em folhas de tomateiro 'Micro-Tom'. Campos dos Goytacazes, 2015.

A coleta das plantas ocorreu 21 dias após a inoculação do patógeno (*X. euvesicatoria*). As plantas foram divididas em duas partes, aérea e radicular. As raízes coletadas foram lavadas até a retirada total do substrato e depois lavadas por mais uma vez em água destilada. Posteriormente determinou-se a massa fresca utilizando balança analítica e a massa seca foi obtida após secagem das amostras em estufa de circulação forçada até massa constante, também pesadas em balança analítica e em seguida armazenadas em sacos de papel, em temperatura ambiente, para posteriormente serem utilizadas para extração de ácidos orgânicos analisados em HPLC.

Os dados de AACPD das plantas inoculadas com *X. euvesicatoria* e os dados de massa foram submetidos a análise de variância e ao teste de comparação de médias DMSt (Diferença mínima significativa de Tukey) em nível de 5% de probabilidade utilizando o programa estatístico SAEG.

3.5. Identificação e quantificação dos ácidos orgânicos em CLAE

A análise de ácidos orgânicos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC em inglês) para a parte aérea das plantas de tomate 'Micro-Tom, previamente seca em estufa, a aproximadamente 60°C até massa constante.

Para a extração de ácidos orgânicos foi utilizado 0,250 ± 0,001 g com 3,5 mL da solução extratora (metanol : ácido acético 10% v/v, na proporção de 85:15 v/v), este material foi macerado no almofariz de porcelana até adquirir consistência líquida, o mais homogênea possível. O extrato obtido foi transferido para um copo de Becker permanecendo no ultrassom por 30

minutos. O volume final foi ajustado para 5 mL de solução com água ultra pura. Centrifugou-se esse extrato já diluído a 100 rpm a 25°C por seis minutos, essa metodologia foi adaptada da descrita por Ross et al. (2009).

Os ácidos orgânicos foram identificados e quantificados por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), com uso de um cromatógrafo *Younglin Instrument* (Seul, Coréia do Sul), com detector UV no comprimento de onda de 210 nm, utilizando coluna REZEX ROA – *Organic acid* H^+ (300 x 7,8 mm). O volume injetado da amostra foi de 20 µL. Utilizou-se como fase móvel água com 280 µL de ácido sulfúrico/L (2,4 mmol ácido sulfúrico/L), com fluxo de 0,6 mL/min, realizado em temperatura ambiente. Os picos correspondentes a cada ácido foram identificados pelo tempo de retenção, utilizando-se como comparação os tempos de retenção dos padrões. Essa metodologia foi desenvolvida pelo NUDIBA/UENF (Núcleo de Desenvolvimento de Insumos Biológicos para a Agricultura) em projetos paralelos. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as diferenças estatísticas foram determinadas por meio do teste de comparação de médias DMSt em nível de significância de 5%. A concentração obtida foi expressa em mg L^{-1} de ácido orgânico.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Teor de C e N nos ácidos húmicos utilizados

O AH obtido de vermicomposto utilizado neste estudo apresentou 41 % de carbono e 4,7 % de N. O valor de carbono está dentro da faixa normalmente encontrada para SH isoladas de vermicomposto e o de N um pouco acima já que normalmente o teor de N em AH de vermicomposto se encontra ao redor de 3%.

4.2. Avaliação da presença de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC 54 no substrato inoculado

Após a inoculação dos substratos relativos aos tratamentos contendo *H. seropedicae* (BAC e AH + BAC) foram realizadas duas contagens de bactérias amostradas em épocas distintas. A primeira, aos cinco dias, teve em média 1,3 x 10^5 UFC/mL, e aos 16 dias após a inoculação foi de 2,0 x 10^4 UFC/mL. Ou

seja, quando inoculou-se a *X. euvesicatoria* aos 21 dias após a inoculação com *H. seropedicae*, provavelmente esta última encontrava-se no substrato. Além disso, o efeito de resistência sistêmica pode ser induzida no preparo da muda e expressa meses depois. Teixeira et al. (2005) observaram resistência até 80 dias após inoculação. O experimento em questão teve início em 20 de maio, sendo que o transplante foi feito em 23 de junho e a aplicação dos tratamentos foi em 24 de junho e as folhas foram coletadas em 04 de agosto de 2015. Assim, o período entre a aplicação da bactéria e a colheita foi de 35 dias.

4.3. Inoculação com *Xanthomonas euvesicatoria* T_1P_3

O patógeno utilizado para inocular o tomateiro estava virulento, pois foram observados sintomas característicos da mancha bacteriana nos tratamentos inoculados com *X. euvesicatoria* T_1P_3, tais como, manchas necrosadas com halos amarelos principalmente das extremidades para o interior da folha, além da presença de senescência antecipada de folhas mais velhas com maior área sintomática (Figura 3).

Figura 3. Sintomas da mancha bacteriana em folíolos de tomate 'Micro-Tom': manchas necróticas com bordo amarelado e amarelecimento generalizado indicando pré-senescência.

4.4. Biomassa de tomate 'Micro-Tom'

A Tabela 1 apresenta os resultados da análise de variância para massas fresca (MF) e seca (MS) da parte aérea (PA) e da planta (raiz + parte aérea) do tomateiro 'Micro-Tom' utilizado neste experimento. Houve diferença altamente significativa para massa fresca da parte aérea e massa total da planta (parte aérea + raiz). Não foi detectada diferença entre as plantas inoculadas e não inoculadas com *X. euvesicatoria*, contudo houve interação entre os tratamentos e a inoculação com *X.euvesicatoria* para a variável massa seca total de planta.

Tabela 1. Resumo da análise de variância para as variáveis massa fresca e massa seca da parte aérea e da planta (raiz + parte aérea) de tomate 'Micro-Tom' tratados com ácidos húmicos e *H. seropedicae* e inoculados ou não com *X. euvesicatoria.*

FV	GL	Quadrados médios			
		MF PA	MF Planta	MS PA	MS Planta
Tratamento – T	3	61,26**	84,55**	2,31^{ns}	2,52^{ns}
X. euvesicatoria – Xe	1	24,26^{ns}	45,83^{ns}	4,28^{ns}	5,49^{ns}
T x Xe	3	15,6^{ns}	25,43^{ns}	0,82^{ns}	0,84*
Resíduo	16	10,7	16,11	1,22	1,25
Total	23				
CV%		12,77	12,89	30,97	27,55

*, **, significativo a 0,05 e 0,01, respectivamente e ^{ns} não significativo pelo teste F. MF = Massa fresca; MS= massa seca; e PA= parte aérea.

As médias da variável MFPA ao serem submetidas ao teste de comparação de médias DMSt (≤0,05) diferiram tanto para tratamentos quanto para inoculação com *Xanthomonas,* isto ocorreu devido aos critérios distintos dos testes de significância. Sem *Xanthomonas* apenas o tratamento AH + BAC foi estatisticamente maior que o controle, enquanto com *Xanthomonas* os tratamentos BAC e AH + BAC responderam diferentemente do controle. Pelo DMSt apenas o AH diferiu reduzindo a MF quando inoculado com *Xanthomonas* similar a média geral dos tratamentos sem e com inoculação com esta bactéria. Na média geral dos tratamentos BAC e AH + BAC foram maiores, ou seja, estes tratamentos incrementam a massa fresca da planta (Tabela 2).

Tabela 2. Médias da variável massa fresca da parte aérea em grama (g) de tomateiro 'Micro-Tom' e seus respectivos desvios padrões (DP) nos diferentes tratamentos utilizados: 1- Controle; 2- Inoculação da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* (BAC); 3- Aplicação de ácidos húmicos (AH); e 4- Aplicação de ácidos húmicos com *H. seropedicae* (AH + BAC). Todos sem e com *Xanthomonas euvesicatoria*

Tratamentos	Sem *X. euvesicatoria*	Com *X. euvesicatoria*	Média total
	MF (média ± DP) g	MF (média ± DP) g	MF (média ± DP) g
Controle	23,79 (± 0,60) B a	20,22 (± 1,99) B a	22,01 (± 2,36) B
AH	26,34 (± 1,95) AB a	21,30 (± 2,18) B b	23,82 (± 3,32) B
BAC	27,03 (± 1,44) AB a	29,44 (± 6,37) A a	28,23 (± 4,30) A
AH + BAC	29,28 (± 3,99) A a	27,44 (± 3,86) A a	28,36 (± 3,65) A
Média total	26,61º (± 2,87) a	24,60 (± 5,32) b	

[1/]Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna e minúsculas na linha não diferem entre si pelo teste DMSt em nível de 5% de probabilidade.

Na Tabela 3, os tratamentos BAC e AH + BAC tiveram médias superiores ao do controle em relação à massa fresca total da planta (raiz + parte aérea) quanto ao teste DMSt, e diferiram quanto a média dos tratamentos sem e com inoculação de *X. euvesicatoria.*

Tabela 3. Médias da variável massa fresca total da planta (raiz + parte aérea) em grama (g) de tomateiro Micro-Tom e seus respectivos desvios padrões (DP) nos diferentes tratamentos utilizados: 1- Controle; 2- Inoculação da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* (BAC); 3- Aplicação de ácidos húmicos (AH); e 4- Aplicação de ácidos húmicos com *H. seropedicae* (AH + BAC). Todos sem e com *X. euvesicatoria*

Tratamentos	Sem *X. euvesicatoria*	Com *X. euvesicatoria*	Média total
	MF (média ± DP) g	MF (média ± DP) g	MF (média ± DP) g
Controle	29,37 (± 2,23) B a	23,63 (± 2,34) B b	26,50 (± 3,75) B
AH	32,79 (± 3,60) AB a	26,54 (± 2,41) B b	29,66 (± 4,38) B
BAC	33,21 (±2,05) AB a	35,80 (± 7,04) A a	34,51 (± 4,85) A
AH + BAC	34,65 (± 4,83) A a	33,00 (± 4,75) A a	33,83 (± 4,38) A
Média total	32,51 (± 3,52) a	29,74 (± 6,41) b	

[1/]Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna e minúsculas na linha não diferem entre si pelo teste DMSt em nível de 5% de probabilidade.

Em relação à massa seca apenas a variável massa seca total da planta foi significativa. Ao comparar as médias pelo teste DMSt, houve semelhança entre os tratamentos AH + BAC e BAC que diferiram do controle (Tabela 4).

Tabela 4. Médias da variável massa seca total da planta (raiz + parte aérea) em grama (g) de tomateiro Micro-Tom e seus respectivos desvios padrões (DP) nos diferentes tratamentos utilizados: 1- Controle; 2- Inoculação da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* (BAC); 3- Aplicação de ácidos húmicos (AH); e 4- Aplicação de ácidos húmicos com *H. seropedicae* (AH + BAC). Todos sem e com *X. euvesicatoria*

Tratamentos	Sem *X. euvesicatoria*	Com *X. euvesicatoria*	Média total
	MS (média ± DP) g	MS (média ± DP) g	MS (média ± DP) g
Controle	4,01 (± 0,33) B a	2,82 (± 0,26) B a	3,42 (± 0,70) C
AH	4,19 (± 0,65) B a	3,03 (± 0,30) B a	3,61 (± 0,78) BC
BAC	4,36 (± 0,11) AB a	4,48 (± 1,47) A a	4,42 (± 0,93) AB
AH + BAC	5,58 (± 2,55) A a	3,97 (± 0,80) AB b	4,77 (± 1,90) A
Média total	4,53 (± 1,30) a	3,58 (±1,02) b	

[1/]Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna e minúsculas na linha não diferem entre si pelo teste DMSt em nível de 5% de probabilidade.

Houve um incremento de massa seca total quando se inoculou AH + BAC em relação ao controle sem e com *X. euvesicatoria* (39% e 41%), respectivamente (Figura 4a,b). Estes resultados estão de acordo com Canellas et al. (2015), que ao avaliarem a biomassa de milho tratado com ácidos húmicos mais *H. seropedicae* (AH + BAC) estirpe Z67, obtiveram valores superiores para todos os tratamentos com AH + BAC. Esse sinergismo pode ser explicado pela capacidade do AH em reter e proteger as bactérias promotoras de crescimento, além de protegerem contra a mancha bacteriana. Já os tratamentos AH e BAC de modo isolado tiveram um incremento de 4 e 9 %, respectivamente (Figura 4a).

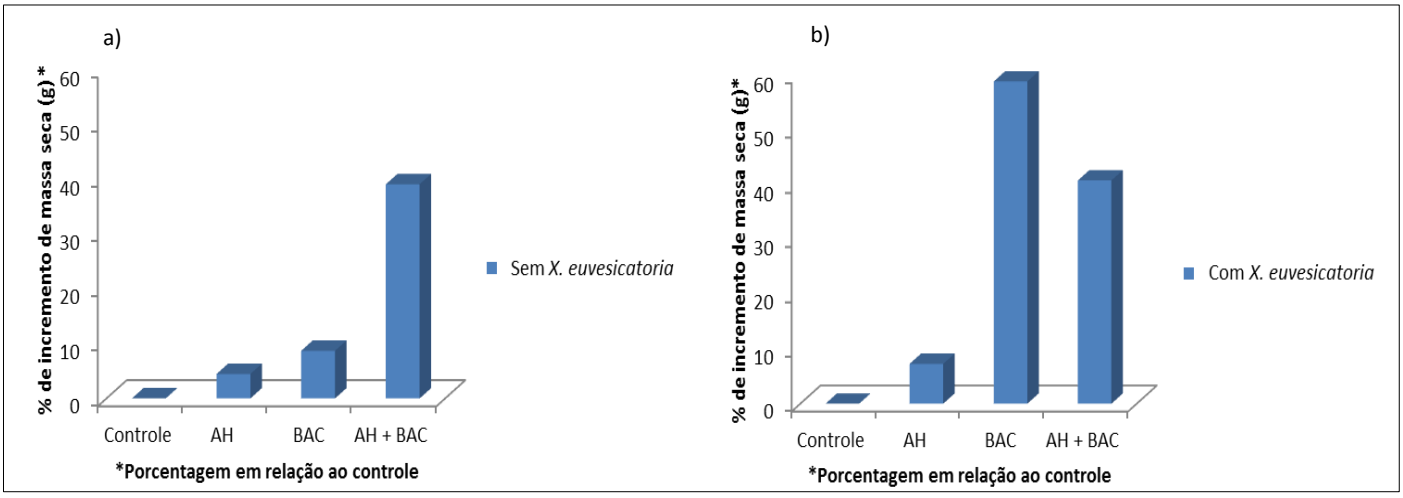

Figura 4. Porcentagem de incremento de massa seca em plantas de tomate 'Micro-Tom' tratados com ácidos húmicos- AH e *H. seropedicae* – BAC em relação ao controle, a) não inoculadas com *Xanthomonas euvesicatoria* e b) inoculadas com *X. euvesicatoria.* Campos dos Goytacazes, 2015.

4.5. Avaliação da resistência à mancha bacteriana

A área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para incidência (número de folíolos) não variou com os tratamentos (Tabela 5, Figura 6 b). Como a *Xanthomonas* é uma bactéria não sistêmica, a inoculação foi realizada por aspersão e a incidência ocorreu quando nos folíolos foram detectados três pontos de mancha, não importando o tamanho destas. Percebeu-se que em alguns tratamentos os sintomas iniciavam nos bordos, com pequenas manchas, não progrediam, mas entravam na contagem de folíolos sintomáticos. Resulta daí a diferença estatística apenas na AACPD para severidade (Tabela 5). Todos os tratamentos diferiram do controle (Figura 5).

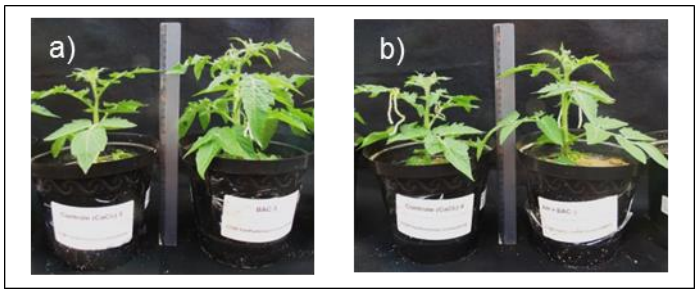

Figura 5. a) Controle com *Xanthomonas euvesicatoria*/BAC com *X. euvesicatoria* b) Controle com *X. euvesicatoria*/AH + BAC com *X. euvesicatoria.*

A severidade da mancha bacteriana foi reduzida a mais de 44,5% quando inoculada com AH + BAC (Figura 6 a). Este fato leva a suposição que tanto o *H. seropedicae* como o AH podem atuar como elicitores de resistência sistêmica induzida já que estes foram aplicados no substrato.

Estudos com rizobactérias do gênero *Bacillus,* com destaque para *B. subtilis* e *B. circulans* concluíram que estas se destacaram na supressão da murcha por fusário (Carrer Filho et al., 2015). Essas rizobactérias podem atuar por diferentes mecanismos de ação, tais como antibiose por metabólitos voláteis e não voláteis, e, inclusive, pela possibilidade de ocorrência de efeitos sinergísticos entre os lipopeptídeos produzidos, o que amplia as possibilidades de sobrevivência, adaptação e controle de uma ampla gama de fitopatógenos.

Em relação à nota de severidade, pode-se observar na Figura 6 que o controle recebeu maior nota de severidade no último dia de avaliação seguido de AH + BAC, depois BAC e por fim AH. O tratamento com apenas AH teve como tendência a estabilização nas duas AACPDs e obteve o menor valor no último dia de avaliação.

Tabela 5. Área abaixo da curva de progresso da doença para severidade da mancha bacteriana em tomate 'Micro-Tom'

Tratamento	[1/]AACPD - Severidade	AACPD - Incidência
Controle	**56 a**	**326 a**
AH	**34 b**	**314 a**
BAC	**33 b**	**338 a**
AH + BAC	**31 b**	**337 a**

[1/]AACPD = Área Abaixo da curva de progresso da doença; AH= ácidos húmicos; BAC= *H. seropedicae*;
Médias seguidas pelas mesmas letras na vertical não diferem entre si pelo teste DMSt em nível de 5% de probabilidade.

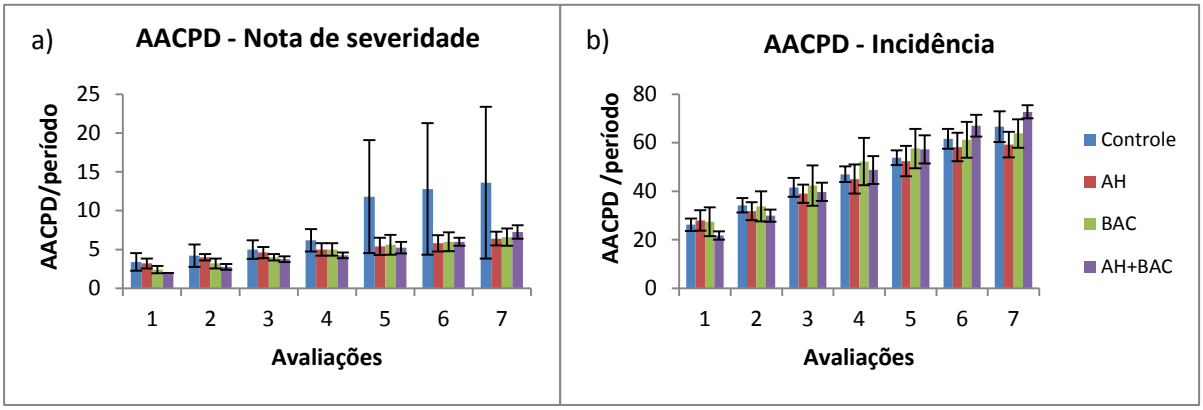

Figura 6. a) Notas da área abaixo da curva de progresso da doença – AACPD obtida a partir das notas de severidade e b) AACPD obtida por incidência da doença (número de folíolos infectados) avaliada por 14 dias em dias alternados, equivalendo a sete avaliações. Campos dos Goytacazes, 2015.

O período de incubação da *Xanthomonas* foi em média de oito dias para o controle e o AH, 10 e 11 dias para BAC e AH + BAC, respectivamente. Quanto maior o tempo para surgimento dos sintomas (manchas necróticas seguidas de desfolha, que comprometem todo o aparato fotossintético) menor é a agressividade da doença. Além disso, aumenta o intervalo de reinoculação, diminuindo assim os danos causados pela doença ao longo do ciclo da planta.

4.6. Identificação e quantificação dos ácidos orgânicos em CLAE

A Figura 7 apresenta os padrões dos ácidos orgânicos identificados e analisados no extrato da parte aérea de tomate 'Micro-Tom', e seus respectivos tempos de retenção. Foram determinadas as concentrações de três ácidos orgânicos que estão relacionados à resistência sistêmica neste ou em outros patossistemas, sendo estes o ácido oxálico, o ácido cítrico e o ácido succínico.

Para a quantificação desses ácidos, primeiramente fez-se uma calibração externa com os padrões de ácido oxálico (Fluka), ácido cítrico (Sigma), ácido maleico (Sigma), ácido tartárico (Sigma), ácido málico (Sigma), ácido succínico (Sigma), ácido fórmico (Sigma) e ácido fumárico (Sigma), obtiveram-se as equações que possibilitaram calcular as concentrações destes ácidos nos extratos (Figura 8) com base nos cromatogramas (Figura 9).

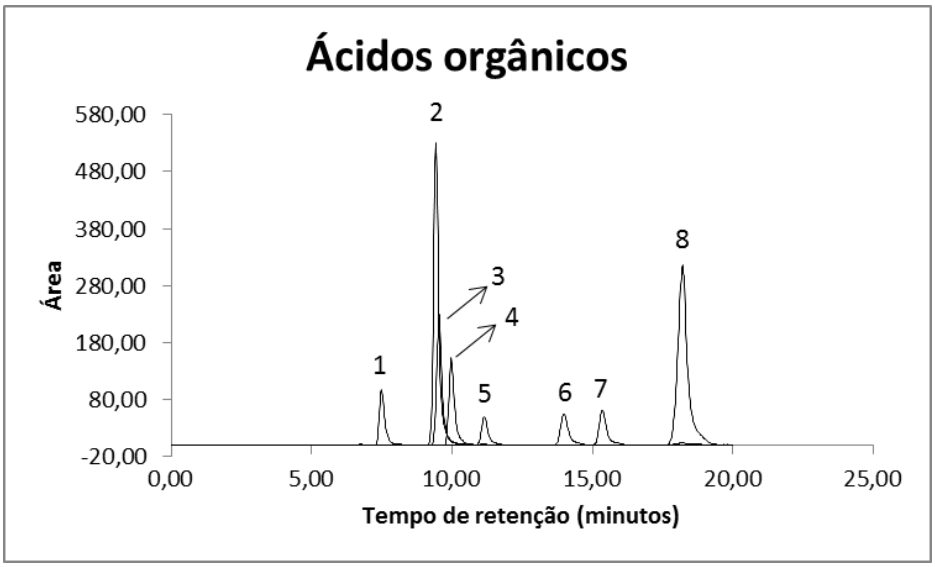

Figura 7. Cromatograma com os padrões dos ácidos orgânicos identificados: 1- Ácido oxálico (7,5 min); 2- Ácido cítrico (9,4 min); 3- Ácido maleico (9,5 min); 4- Ácido tartárico (10,0 min.) 5- Ácido málico (11,1 min); 6- Ácido succínico (14,0 min); 7- Ácido fórmico (15,35 min.); e 8- Ácido fumárico (18,2 min.).

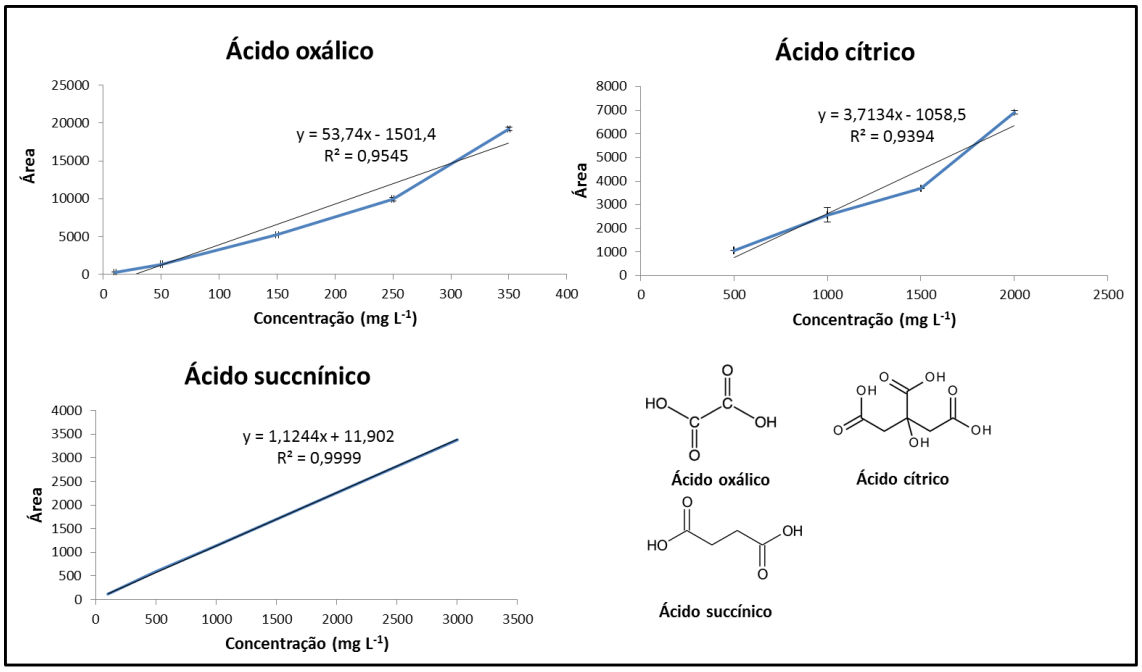

Figura 8. Curvas de calibração dos ácidos orgânicos analisados: oxálico, cítrico e succínico e suas respectivas estruturas moleculares.

A faixa de concentração avaliada foi de 10 a 350 mg L^{-1} para o ácido oxálico com cinco pontos na curva analítica; de 500 a 2000 mg L^{-1} para o ácido cítrico com quatro pontos na curva analítica e para o ácido succínico a faixa de concentração analisada foi de 50 a 3000 mg L^{-1} com cinco pontos na curva analítica.

Os dados de concentração não seguiram distribuição normal, pois existem dados nulos, que mesmo transformados para raiz quadrada de x+0,5 só foram significativos pelo teste F a 10%, apesar de darem significativos pelo teste DMSt a 5%. Assim, optou-se por fazer apenas a análise descritiva (Tabela 6).

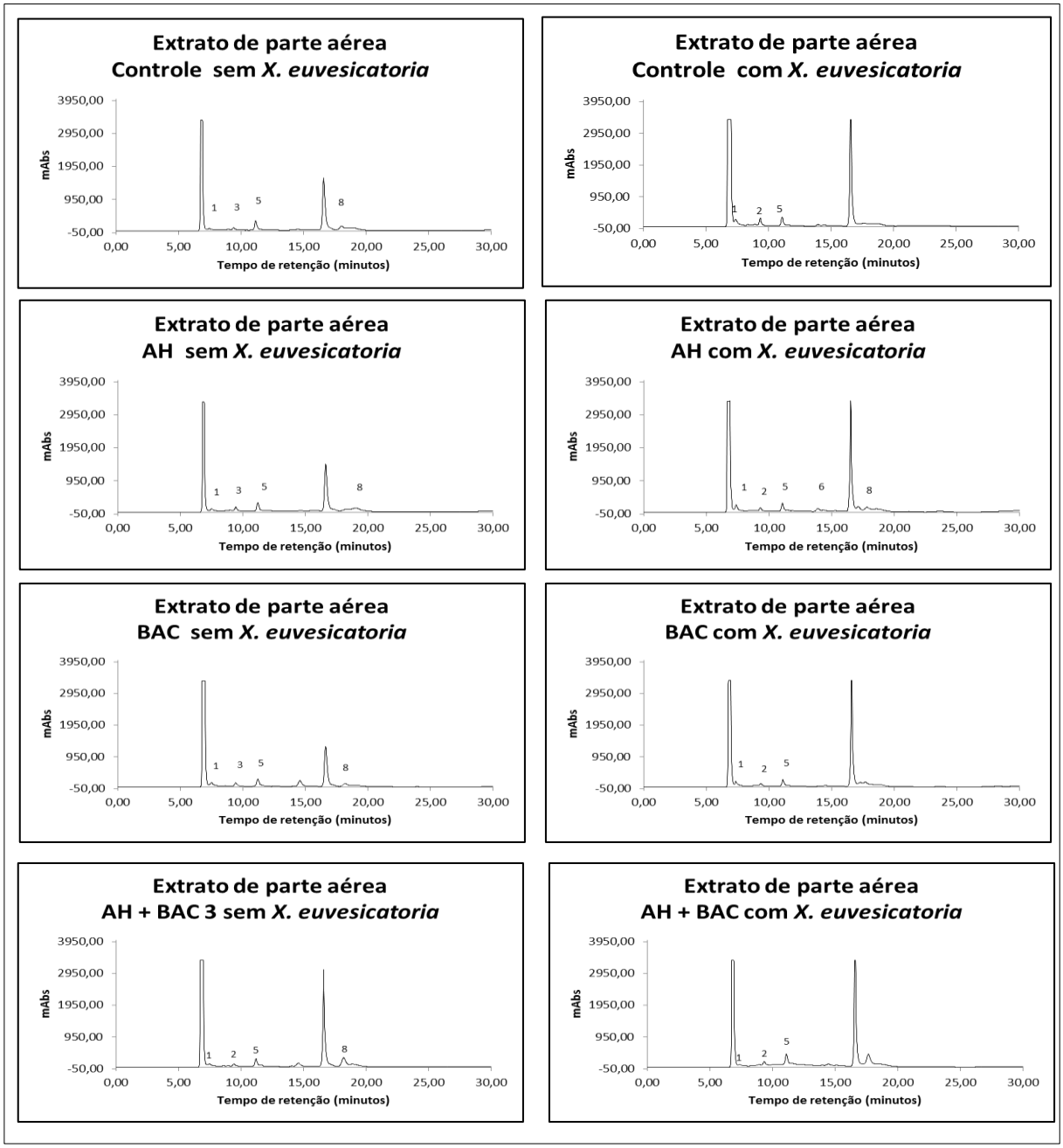

Figura 9. Cromatogramas de extratos de parte aérea de tomate 'Micro-Tom' tratados com Cloreto de cálcio 2 mmol L^{-1} = Controle, Aplicação de ácido húmico = AH, Inoculação de *H. seropedicae* = BAC e a aplicação de ácido húmico com a inoculação *H. seropedicae* = AH + BAC.

Ao analisar as concentrações dos ácidos orgânicos nos tratamentos com e sem *X. euvesicatoria* todos os tratamentos com *X. euvesicatoria* produziram mais ácido oxálico que os tratamentos sem *X. euvesicatoria.*

Todos os tratamentos com *X. euvesicatoria* apresentaram maiores concentrações de ácidos orgânicos em relação aos tratamentos sem *X. euvesicatoria* na parte aérea. Esta observação está de acordo com Jones et al.

(1998) que verificaram aumentono teor de ácidos orgânicos proporcionalmente ao estresse sofrido pela introdução de um patógeno na planta.

Tabela 6. Médias da variável concentração de ácido oxálico em mg L^{-1} dos extratos de parte aérea de tomateiro 'Micro-Tom' e seus respectivos desvios padrões (DP) nos diferentes tratamentos utilizados: 1- Controle; 2- Inoculação da bactéria *H. seropedicae* (BAC); 3- Aplicação de ácidos húmicos (AH); e 4: Aplicação de ácidos húmicos com *H. seropedicae* (AH + BAC). Todos sem e com *X. euvesicatoria*

Tratamentos	Sem *X. euvesicatoria*	Com *X. euvesicatoria*	Média total
	[oxálico] (média ± DP) mg L^{-1}	[oxálico] (média ± DP) mg L^{-1}	[oxálico] (média ± DP) mg L^{-1}
Controle	73,75 (± 0,07) A b	220,53 (± 129,29) A a	161,82 (± 121,75) A
AH	79,13 (± 10,69) A a	131,60 (± 2,40) B a	100,12 (± 29,74) B
BAC	84,35 (± 27,93) A a	75,40 (± 49,56) B a	78,98 (± 38,04) B
AH + BAC	92,75 (± 1,63) A a	120,35 (± 50,56) B a	106,55 (± 33,27) AB
Média total	82,12 (± 13,30) b	139,17 (± 90,55) a	

[1/]Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna e minúsculas na linha não diferem entre si pelo teste DMSt em nível de 5% de probabilidade.

O ácido oxálico está ligado a senescência e morte celular programada. (KIM et al. 2008), a senescência foi observada no controle com *X. euvesicatoria* e também o amarelecimento das folhas indicando maior severidade da doença por ter maior área foliar infectada (maior área necrótica), podendo estar relacionadas ou não com a morte celular programada. A concentração do patógeno aplicada 10^8 UFC/mL é considerada elevada, podendo influenciar nesse sintoma observado.

Na Tabela 7 são apresentadas as concentrações de ácido cítrico. O tratamento controle com *X. euvesicatoria* também apresentou maior concentração de ácido cítrico. A aplicação do ácido cítrico associado aos ácidos lático e ascórbico resultou no controle da murcha bacteriana sendo essa mistura de ácidos imergidas na raiz, já na aplicação foliar houve redução de 46% na AACPD (Garcia et al., 2014). E Cavalcanti et al. (2006) também relatou redução da severidade da mancha bacteriana em tomateiro com a aplicação do acibenzolar-S-metil e do Ecolife® ("Biomassa cítrica" que contêm polifenóis, ácido ascórbico, ácido lático e ácido cítrico, entre outros componentes). Foi observado que na quantificação de ácido cítrico, houve discordância da

literatura, pois o tratamento que teve maior concentração deste ácido foi o que apresentou maior severidade da doença.

Tabela 7. Médias da variável concentração de ácido cítrico em mg L^{-1} dos extratos de parte aérea de tomateiro 'Micro-Tom' e seus respectivos desvios padrões (DP) nos diferentes tratamentos utilizados: 1- Controle; 2- Inoculação da bactéria *H. seropedicae* (BAC); 3- Aplicação de ácidos húmicos (AH); e 4- Aplicação de ácidos húmicos com *H. seropedicae* (AH + BAC). Todos sem e com *X. euvesicatoria*

Tratamentos	Sem *X. euvesicatoria*	Com *X. euvesicatoria*	Média total
	[cítrico] (média ± DP) mg L^{-1}	[cítrico] (média ± DP) mg L^{-1}	[cítrico] (média ± DP) mg L^{-1}
Controle	776,35 (± 102,74) A a	1426,43 (± 1382,12) Aa	1166,40 (± 1041,42) A
AH	0,00 (± 0,00) A a	944,20 (± 207,89) A a	377,68 (± 527,50) AB
BAC	458,00 (± 647,71) A a	563,30 (± 539,78) A a	350,08 (± 700,15) B
AH + BAC	0,00 (± 0,00) A a	700,15 (± 990,16) A a	521,18 (± 503,88) B
Média total	274,30 (± 415,01) b	925,79 (± 861,23) a	

[1/]Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna e minúsculas na linha não diferem entre si pelo teste DMSt em nível de 5% de probabilidade.

A Tabela 8 apresenta as concentrações do ácido succínico. O tratamento AH + BAC com *X. euvesicatoria* apresenta maior concentração deste ácidoseguido de AH com *X. euvesicatoria*. Este ácido está relacionado com a tolerância a estresses abióticos, tais como tolerância a alumínio em cultivares de soja (Menosso et al., 2001) e a seca em feijoeiro (Suzuki et al., 1987). Kamilova et al. (2006) estudaram ácidos orgânicos de exsudatos de raízes de tomateiros inoculados com *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* confrontados com biocontrole bacteriano (*Pseudomonas fluorescens*). Os autores observaram que a quantidade total de ácidos orgânicos não diferiu entre o controle e o tratamento não inoculado com *P. fluorescens*, contudo teve um decréscimo de ácido cítrico e um aumento de ácido succínico. Já nos tratamentos com *Pseudomonas* aumentou o total de ácidos orgânicos, diminuiu drasticamente o succínico e aumentou o cítrico. Ou seja, estes resultados estão de acordo com os observados apesar de ser endógeno. Pois nos tratamentos inoculados com *H. seropedicae* com *X. euvesicatoria* o teor de ácido succínico foi o menor, já sem *H. seropedicae* foi o segundo maior.

Tabela 8. Médias da variável concentração de ácido succínico em mg.L^{-1} dos extratos de parte aérea de tomateiro 'Micro-Tom' e seus respectivos desvios padrões (DP) nos diferentes tratamentos utilizados: 1- Controle; 2- Inoculação da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* (BAC); 3- Aplicação de ácidos húmicos (AH); e 4: Aplicação de ácidos húmicos com *H. seropedicae* (AH + BAC). Todos sem e com *Xanthomonas euvesicatoria*

Tratamentos	Sem *X. euvesicatoria*	Com *X. euvesicatoria*	Média total
	[succínico] (média ± DP) mg L^{-1}	[succínico] (média ± DP) mg L^{-1}	[succínico] (média ± DP) mg L^{-1}
Controle	455,80 (± 188,51) A a	1168,87 (± 318,87) BC a	883,64 (±460,71) A
AH	748,00 (± 258,11) A a	1593,45 (± 1375,53) AB a	1086,18 (±848,98) AB
BAC	547,50 (± 92,35) A a	720,27 (± 398,52) AB a	651,16 (±300,82) AB
AH + BAC	611,85 (± 326,61) A b	2244,10 (± 1115,53) C a	1427,98 (±1156,91) B
Média total	668,26 (± 222,62) b	1334,25 (± 860,26) A a	

[1/]Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna e minúsculas na linha não diferem entre si pelo teste DMSt em nível de 5% de probabilidade.

Não foi observada nenhuma relação entre a atenuação do sintoma da mancha bacteriana e a produção de ácidos orgânicos nos tratamentos com AH e BAC.

5. Conclusões

Os ácidos húmicos e a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* aplicados isoladamente ou em conjunto atenuaram a sintomatologia da mancha bacteriana causada por *Xanthomonas euvesicatoria.*

Os AH induziram o aumento de concentração de ácido succínico, pois tanto no tratamento AH quanto no AH + BAC, foram as maiores concentrações com e sem inoculação de *X. euvesicatoria*. E este ácido apresentou maior concentração nos tratamentos com *X. euvesicatoria*, destacando-se o tratamento AH + BAC com praticamente a soma das concentrações observadas para AH e BAC. Para o ácido oxálico, a maior concentração foi no controle com a inoculação do patógeno, sendo coerente com a literatura.

Referências bibliográficas

ADAPAR, 2015. Disponível em www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Outros/BION_500_WG.pdf. Acesso em 31 de outubro de 2015.

AGROFIT, Mancha bacteriana em tomate – controle químico. Disponível em agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em 30 de outubro de 2015.

Aguiar, L.A., Kimura, O., Castilho, A.M.C., Castilho, K.S.C., Ribeiro, R.L.D., Akiba, F., Carmo, M.G.F. (2000) Resistência ao cobre em isolados nacionais de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* de pimentão e tomateiro. Agronomia, 34: 78-82.

ANVISA, Número de amostras analisadas por cultura e resultados insatisfatórios (2012), página 19. Disponível em http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect. Acesso em 30 de outubro de 2015.

Barbosa, A.S. Medeiros, M.B. (2007) Potencial de ação elicitora dos biofertilizantes líquidos na indução de resistência sistêmica vegetal. *Rev. Bras. de Agroecologia*/out. 2(2): 1453-1457.

Brasil, Decreto n. 4954, de 14 de janeiro de 2004. Dispõe sobre a inspeção e fiscalização da produção e do comércio de fertilizantes, corretivos, inoculantes, ou biofertilizantes, remineralizadores e substratos para plantas destinados à agricultura. Disponível em http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2004/decreto/d4954.htm. Acesso em 01 de novembro de 2015.

Burris, R.H. Organic acids in plant metabolism. Annu. *Rev. Plant. Physiol.* 1953.4:91-114.

Campbell, C.L., Madden, L.V. (1990). Introduction to plant disease epidemiology.

Canellas, L. P., da Silva, S. F., Olk, D. C., & Olivares, F. L. (2015). Foliar application of plant growth-promoting bacteria and humic acid increase maize yields. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, *13*(1), 131-138.

Canellas, L. P., Teixeira Junior, L. R. L., Dobbss, L. B., Silva, C. A., Medici, L. O.,Zandonadi, D. B., & Façanha, A. R. (2008). Humic acids cross interactions with root and organic acids. *Annals of Applied Biology*, *153*(2), 157-166.

Canellas, L.P.; Santos, G. A. (2005) Humosfera: tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas, Campos dos Goytacazes, 309 p.

Carmo, M.G.F. do, Kimura, O., Maffia, L.A., Carvalho, A.O. de. (1996) Determinação do nível de tolerância de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em sementes de pimentão. *Fitopatologia Brasileira*, 21 (3): 336-341.

Carrer Filho, R., Dianese, E. C., Cunha, M. G. (2015). Supressão da murcha de fusário em tomateiro por rizobactérias do gênero *Bacillus*. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, *45*(3), 356-363.

Cavalcanti, F. R., Resende, M. D., Pereira, R. B., Costa, J. D. B., & Carvalho, C. D. S. (2006). Atividades de quitinase e beta-1, 3-glucanase após eliciação das defesas do tomateiro contra a mancha-bacteriana. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, *41*(12), 1721-1730.

Chang, K.; Roberts, J. K. (1991). Cytoplasmic malate levels in maize root tips during K+ ion uptake determined by 13 C-NMR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, *1092*(1), 29-34.

Cohen Y (1993) Local and systemic control of *Phytophthora infestans* in tomato plants by DL-3-amino-n-butanoic acids. *Phytopathology* 84: 55–59

Costa, R.B., Resende, M.D.V.,Araújo, A.J., Gonçalves, P.S., Bortoletto, N. (2000) Seleção combinada univariada e multivariada aplicada ao melhoramento genético da seringueira. *Pesq. Agropec. Bras.*, 35 (2): 381-388.

Demir, S., Şensoy, S., Ocak, E.,Tüfenkçi, Ş., Durak, E. D., Erdinc, C., Ünsal, H. (2015). Effects of arbuscular mycorrhizal fungus, humic acid, and whey on wilt disease caused by *Verticillium dahlia Kleb.* in three solanaceous crops. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, *39*, 300-309.

Dobbss, L. B., Rumjaneck, V. M., Baldotto, M. A., Velloso, A. C. X., Canellas, L. P. (2009). Caracterização química e espectroscópica de ácidos húmicos e fúlvicos isolados da camada superficial de Latossolos brasileiros. *Bras. Ci. Solo*, *33*, 51-63.

Döbereiner, J., Baldani, V. L., Reis, V. M. (1995).Endophytic occurrence of diazotrophic bacteria in non-leguminous crops. In *Azospirillum VI* and related microorganisms .*Springer* Berlin Heidelberg. (p. 3-14)

Ertani, A., Schiavon, M., Altissimo, A., Franceschi, C., Nardi, S. (2011). Phenol-containing organic substances stimulate phenylpropanoid metabolism in *Zea mays*. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, *174*(3), 496-503.

FAOSTAT, Produtividade média de tomate em 2013. Disponível em http://faostat3.fao.org/. Acesso em 30 de outubro de 2015.

Garcia A.L., Souza, E.B.; Mariano, R.L.R. (2014) Ácidos orgânicos no controle da murcha bacteriana do pimentão. *Brazilian Journal of Agricultural Sciences* 9(2) 225-230.

Guimarães R.L., Stotz H.U. Oxalate production by *Sclerotinia sclerotiorum* deregulates guard cells during infection. *Plant Physiology* 136: 3703-3711. 2004
Hibberd, A. M., Stall, R. E., Bassett, M. J. (1988) Quantitatively assessed resistance to bacterial leaf spot in pepper that is simply inherited. *The American Phytopathological Society* 78(5): 607-612.

Jones, D. L. (1998).Organic acids in the rhizosphere–a critical review. *Plant and soil*, *205*(1), 25-44.

Jones, J.B., Lacy, G.H., Bouzar, H., Stall, R.E., Schaad, N.W. (2004) Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *System. Appl. Microbiol.*, 27: 755-762.

Jones, J.B., Stall, R.E., Bouzar, H. (1998) Diversity among xanthomonads pathogenic on pepper and tomato. Phytopathol. 16: 41-58.

Juhász, A. C. P., Rodrigues, R., Olivares, F. L., Araujo, J. S. P. (2006) Interações entre *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* e genótipos resistentes ou suscetíveis de *Capsicum annuum* em tecidos foliares inoculados. *Agronomia* 40(1-2):27-34.

Juhász, A.C.P. (2002) Herança da resistência à mancha bacteriana em pimentão e avaliações estruturais associadas à interação *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* – *Capsicum annuum* L. Tese (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 86p.

Kamilova F., Kravchenko L. V., Shaposhnikov A. I., Azarova T., Makarova N., Lugtenberg B. (2006). Organic acids, sugars and L-tryptophane in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. *Mol. Plant Microbe Interact.* 9 250–256

Kesarwani, M., Azam, M., Natarajan, K., Mehta, A., Datta, A. (2000). Oxalate decarboxylase from *Collybia* velutipes molecular cloning and its overexpression to confer resistance to fungal infection in transgenic tobacco and tomato. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(10), 7230-7238.

Kim, K. S., Min, J. Y., Dickman, M. B. (2008). Oxalic acid is an elicitor of plant programmed cell death during *Sclerotinia sclerotiorum* disease development. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *21*(5), 605-612.

Kloepper, J. W., Tuzun, S., and Kuc, J. A. 1992. Proposed definitions related to induced disease resistance. *Biocontrol Sci. Technol.* 2:349- 351.

Ma, J.F., Ryan P.R., Delhaize E. (2001) Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *TRENDS in Plant Science* 6(6), 1360-1385.

Medeiros, D.C.; Lima, B.A.B; Barbosa, M.R., Anjos, R.S.B.; Borges, R.D.; Cavalcante Neto, J.G.; Marques, L.F. (2007) Produção de mudas de alface com biofertilizantes e substratos. *Horticultura Brasileira* 25: 433-436.

Mello, S.C.; Takatsu, A.; Lopes, C.A. (1997) Escala diagramática para avaliação da mancha-bacteriana do tomateiro. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.22, n.3, p.447-448

Menosso, O. G., Costa, J. A., Anghinoni, I., Bohnen, H. (2001) Crescimento radicular e produção de ácidos orgânicos em cultivares de soja com diferentes tolerâncias ao alumínio. *Pesq. Agrop. Bras*, *36*, 1339-1345.

Métraux, J.P. (2001) Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge. *European Journal of Plant Pathology*, 107(1), 13-18.

Motoyama M.M., Schwan-Estrada K. R. F., Stangarlin J. R., A.C.G., Scapim C.A. (2003) Efeito antimicrobiano de extrato cítrico sobre *Ralstonia solanacearum* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis. Acta Scientiarum. Agronomy* 25(2) 509-512.

Noyes, R. D., Hancock J. G. (1981) Role of oxalic acid in the Sclerotinia wilt of sunflower. *Physiological Plant Pathology* 18.2: 123-132.

Olivares, F. L., Aguiar, N. O., Rosa, R. C. C., Canellas, L. P. (2015) Substrate biofortification in combination with foliar sprays of plant growth promoting bacteria and humic substances boosts production of organic tomatoes. *Scientia Horticulturae*, *183*, 100-108.

Patten, C. L., Glick, B. R. (2002) Role of Pseudomonas putida indole acetic acid in development of the host plant root system. *Applied and environmental microbiology*, *68*(8), 3795-3801.

Pieterse, C. M., Van Wees, S. C., Van Pelt, J. A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P.J., Van Loon, L. C. (1998). A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *10*(9), 1571-1580.

Pieterse, C.M.J.; Pelt, J.A. van; Wees, A.C.M. van; Ton, J.; Verhagen, B.W.M.; Léon-Kloosterziel, K.; Hase, S.; Vos, M. de; Oosten, V. van; Pozo, Maria J.; Spoel, S.H.; Ent, S. van der; Koornneef, A.; Chalfun-Junior, A.; Resende, M.L.V.; Loon, L.C. van (2005) Indução de resistência sistêmica por rizobactérias e comunicação na rota de sinalização para uma defesa refinada. *Revisão anual de Patologia de Plantas*, 13, 277 - 319

Puglisi, E., Fragoulis, G., Ricciuti, P., Cappa, F., Spaccini, R., Piccolo, A., Trevisan, M., Crecchio, C. (2009). Effects of a humic acid and its size-fractions on the bacterial community of soil rhizosphere under maize (Zea mays L.). *Chemosphere*, *77*(6), 829-837.

Puglisi, E., Pascazio, S., Suciu, N., Cattani, I., Fait, G., Spaccini, R. &Trevisan, M. (2013). Rhizosphere microbial diversity as influenced by humic substance amendments and chemical composition of rhizodeposits. *Journal of Geochemical Exploration*, *129*, 82-94.

Puglisi, E.,Fragoulis, G., Del Re, A. A., Spaccini, R., Piccolo, A., Gigliotti, G., Trevisan, M. (2008). Carbon deposition in soil rhizosphere following amendments with compost and its soluble fractions, as evaluated by combined

soil–plant rhizobox and reporter gene systems. *Chemosphere*, *73*(8), 1292-1299.

Quezado-Duval, A.M., Gazzoto Filho, A., Leite Júnior, R.P., Camargo, L.E.A. (2003) Sensibilidade a cobre, estreptomicina e oxitetraciclina em *Xanthomonas* spp. associadas à mancha-bacteriana do tomate para processamento industrial. *Horticultura Brasileira,* Brasília, v. 21, n. 4, p.670-675.

Raaijmakers, J. M., Weller, D. M. (1998) Natural plant protection by 2, 4-diacetylphloroglucinol-producing Pseudomonas spp. in take-all decline soils. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *11*(2), 144-152.

Riva, E.M. (2002) Análise de gerações para reação à mancha bacteriana e outros caracteres agronômicos em *Capsicum annuum L.* Tese (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ – Universidade Estadual do Norte Fluminenese – UENF, 91p.

Rodrigues Neto, J.; Malavolta Júnior, V. A., Victor, O. (1986) Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* tipo B. *Summa Phytopathologica*, 12 (1-2): 16.

Ross, K.A., Beta T., Arntfield S.D. (2009) A comparative study on the phenolic acids identified and quantified in dry beans using HPLC as affected by different extraction and hydrolysis methods. *Food Chemistry*, 113:336-344.

Rudrappa, T., Czymmek, K.J., Paré, P.W., Bais, H.P. (2008) Root-Secreted Malic Acid Recruits Beneficial Soil Bacteria *Plant Physiology*, 148: 1547-1556.

Ryan, R. P., Vorhölter, F., Potnis N., Jones J.B., Sluys, M. V., Bogdanove, A.J., Dow, J. M. (2011) Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions.*Nature reviews* | *Microbiology* 9: 344-355

Schiavon, M., Pizzeghello, D., Muscolo, A., Vaccaro, S., Francioso, O., &Nardi, S. (2010). High molecular size humic substances enhance phenylpropanoid

metabolism in maize (*Zea mays L.*). *Journal of chemical ecology*, *36*(6), 662-669.

Schons, R. F., de Freitas, M. B., Stadnik, M. J. (2011). Durabilidade da resistência induzida por ulvana e efeito da concentração de inóculo no controle da antracnose do feijão. *Bioscience Journal*, *27*(4).

Schulten, H. R., Schnitzer, M. (1997). The chemistry of soil organic nitrogen: a review. *Biology and Fertility of Soils*, 26(1), 1-15.

Silva, F.A.M., Nogueira, F.D., Ribeiro, L.L., Godinho, A. e Guimarães, P.T.G. (2001) Exsudação de ácidos orgânicos em rizosfera de plantas daninhas. *Planta Daninha*, Viçosa-MG, v.19, n.2, p.193-196.

Singh, Sanjay (2014). Guttation: path, principles and functions. *Australian Journal of Botany* 61(7): 497-515

Suzuki,S., Yamada, K., Takano, T. (1987) Effect of succinic acid 2, 2-dimethylhydrazide on drought tolerance of bean plant, *Science Report*, vol. 23, p. 15–22.

Teixeira, D. A., Alfenas, A. C., Mafia, R. G., Maffia, L. A., Ferreira, E. M. (2005). Evidências de indução de resistência sistêmica à ferrugem do eucalipto mediada por rizobactérias promotoras do crescimento de plantas. *Fitopatologia Brasileira*, *30*(4), 350-356.

Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M., Pieterse, C.M.J. Mechanisms of PGPR-induced resistance against pathogens. In:Proc. of Fourth Int. workshop on plant-growth-promoting rhizobacteria. Sapporo, Japan, 1997. pp.50-57.

Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M., Pieterse, C.M.J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 36:453-483. 1998.

Zhu Y., Yu J. Brecht, J.K., Jiang T., Zheng X. (2016) Pre-harvest application of oxalic acid increases quality and resistance to *Penicillium expansum* in kiwifruit during postharvest storage. *Food Chemistry* 190(1), 537–543.