



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

Denise Faccin

**Compostos naturais como bioestimulantes e indutores de resistência à mancha
bacteriana em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.)**

Florianópolis

2022

Denise Faccin

**Compostos naturais como bioestimulantes e indutores de resistência à mancha
bacteriana em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.)**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutor (a) em Ciências com ênfase em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Robson Marcelo Di Piero

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Faccin, Denise

Compostos naturais como bioestimulantes e indutores de resistência à mancha bacteriana em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) / Denise Faccin ; orientador, Robson Marcelo Di Piero, 2022.

103 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Compostos naturais. 3. Indução de Resistência. 4. Promoção de crescimento. 5. Mancha bacteriana. I. Di Piero, Robson Marcelo. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. III. Título.

Denise Faccin

Compostos naturais como bioestimulantes e indutores de resistência à mancha bacteriana em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.)

O presente trabalho a nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Dr.(a) Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada
Universidade Estadual de Maringá

Prof.(a) Dr.(a) Rosete Pescador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Dr.(a) Mateus Brusco de Freitas
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Ciências com ênfase em Recursos Genéticos Vegetais.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Robson Marcelo Di Piero
Orientador(a)

Florianópolis, 2022.

Dedico este trabalho a todos os agricultores, principalmente aos meus pais e avós, que sempre buscaram, incentivaram e ensinaram a produção de alimentos baseada no respeito ao solo, às águas, às plantas e à saúde das pessoas.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a mim, por não ter desistido do meu sonho de formação e atuação frente a todas as dificuldades que tive durante esse período, e, principalmente por ter dado o melhor de mim até o final. Hoje consigo dizer, com um sorriso no rosto cansado, que eu consegui!

Agradeço a minha mãe pelo apoio, incentivo e amor incondicional. Por ser exemplo em tudo na minha vida, principalmente por ser minha maior inspiração na criação das minhas hortas, pela troca de conhecimento, pelo amor e cuidado que dedica à natureza e à produção de alimentos.

Agradecerei eternamente ao meu pai por todos os ensinamentos de simplicidade e o gosto pela terra. De onde estiver, saiba que eu consegui!

Agradeço aos meus irmãos queridos, que mesmo distantes daqui, estiveram sempre ao meu lado, me apoiando, dando força, sendo exemplos de superação, ética e muito trabalho duro, trocando experiências e compartilhando momentos felizes.

Agradeço ao meu marido, que sempre foi compreensivo, parceiro e grande incentivador, esteve ao meu lado nos melhores e piores momentos desses últimos 10 anos, sempre segurando a minha mão e falando que tudo daria certo. Agradeço por tantos dias e noites que assumiu integralmente os cuidados com o filho, para que eu pudesse finalizar minhas análises, ou escrita de artigos e tese.

Agradeço ao meu filho, que chegou na minha vida no meio do doutorado, e veio pra trazer tanta alegria, tanta emoção, tantos sentimentos novos! Mas o principal, foi a força que ele me deu, através dos sorrisos, da evolução do seu entendimento, da felicidade ao me ver chegar em casa depois de um dia duro no laboratório.

Agradeço ao meu psicólogo que me ajudou a voltar a acreditar no meu potencial e nas minhas qualidades. Sua escuta e suas palavras me trouxeram alívio e compreensão.

Agradeço aos colegas de laboratório pela convivência e conversas, que tanto fez falta durante a pandemia, quando nos distanciamos fisicamente. Juntos somos melhores!

Agradeço ao Tiago Tomazetti pela ajuda com as análises estatísticas e co-autoria em um dos artigos, e à Manoela Cristina pela ajuda com a tradução.

Agradeço ao orientador Robson Di Piero pelas incansáveis correções da tese e artigos, e por aceitar orientar as minhas ideias.

Agradeço aos membros da banca, Dra Kátia Regina Schwan-Estrada, Dra Rosete Pescador, Dr. Mateus Freitas, por aceitarem participar desta etapa tão importante do meu doutorado e dedicarem seu tempo e colaboração para a melhoria do meu trabalho.

Agradeço à CAPES, que mesmo nesse momento em que a ciência é diariamente atacada sofrendo cortes, por manter a bolsa PROEX que recebi desde o começo do doutorado e que permitiu que eu me mantivesse financeiramente neste tempo.

Agradeço à UFSC e ao CCA, por serem meu segundo lar, onde encontrei professores incríveis que repassaram conhecimentos que levarei para a vida toda. Agradeço e enalteço o ensino público, gratuito e de alta qualidade. Tenho orgulho de ser UFSC, tenho orgulho de ser CCA!

RESUMO

O cultivo do tomateiro é de grande importância social e econômica no país, e é acometido por diversas doenças que podem reduzir a produtividade dessa hortaliça. A mancha bacteriana é uma das doenças mais devastadoras em tomateiros cultivados em ambientes quentes e úmidos. O manejo desta doença é difícil devido à rápida multiplicação dos patógenos nos tecidos infectados, à ausência de produtos químicos adequados e à ausência de variedades de tomate com resistência satisfatória. O presente trabalho buscou nos compostos naturais alternativas ambientalmente amigáveis para o controle da mancha bacteriana em tomateiros, desvendando os mecanismos de ação envolvidos e acompanhando as alterações na fisiologia das plantas tratadas e inoculadas. Os polissacarídeos de babosa (PB), o hidrolato de melaleuca (HI) e o vermicomposto líquido (VL) são produtos naturais extraídos de plantas ou da decomposição da matéria orgânica, que podem atuar no controle de *Xanthomonas hortorum* pv. *gardneri* de maneira direta, graças à ação antimicrobiana dos princípios ativos, ou de maneira indireta, elicitando os mecanismos de defesa da planta através da indução de resistência. Os compostos naturais podem ainda aumentar o metabolismo antioxidante e bioestimular o crescimento das plantas, deixando-as mais resistentes a estresses bióticos e abióticos. O efeito antimicrobiano dos compostos naturais foi testado *in vitro* pela inibição na formação de biofilme microbiano, sendo o HI (50 $\mu\text{L mL}^{-1}$) responsável pela redução de 57% do biofilme bacteriano. O efeito sobre a severidade da mancha bacteriana foi avaliado a partir da pulverização dos compostos nas folhas de tomateiros, três dias antes da inoculação com o patógeno. O VL (10 mg COT mL^{-1}) foi o composto que mais reduziu o desenvolvimento dos sintomas, não passando de 6% a área foliar lesionada, provavelmente devido ao potencial antioxidante e ao aporte de microrganismos benéficos após a pulverização foliar deste composto. A análise de desenvolvimento visou comparar os aumentos de biomassa da parte aérea e das raízes, bem como a altura das plantas tratadas com os compostos. O VL e, surpreendentemente, os PB promoveram o aumento de todos os parâmetros fisiológicos, comprovados pelo aumento da enzima nitrato redutase, determinada em plantas inoculadas e não inoculadas. Para quantificar o dano celular causado pelo estresse oxidativo e o potencial de detoxificação das plantas tratadas com os compostos naturais, foram feitas análises de peroxidação lipídica e quantificação e acúmulo de peróxido de hidrogênio. O composto que promoveu maior proteção aos danos nas membranas das plantas inoculadas foi o PB, seja pelo seu potencial antioxidante quanto de proteção física. Para avaliação das respostas bioquímicas de defesa da planta, foram mensuradas as atividades de algumas enzimas antioxidantes como a catalase (CAT) e a ascorbato peroxidase (APX), e a fenilalanina amônia-liase (FAL). Os PB e o HI promoveram aumentos significativos das enzimas antioxidantes rapidamente após a inoculação, além disso, plantas tratadas com PB apresentaram altas atividades da FAL, sugerindo que a resistência das plantas foi induzida pelo uso preventivo destes polissacarídeos. As substâncias húmicas presentes no vermicomposto foram fracionadas pela acidificação do extrato húmico total, até obtenção dos ácidos húmicos (AH) e fúlvicos (AF), pulverizados nas plantas de tomate. Todas as frações e extratos reduziram a severidade da doença, sendo a fração dos AH a mais bioativa, promovendo maiores atividades das enzimas antioxidantes e de defesa, maior crescimento das plantas, maiores conteúdos de clorofila, além de aumentar a eficiência do fotossistema II. Dessa forma, nota-se o grande potencial dos compostos naturais, seus extratos e frações em controlarem a mancha bacteriana em tomateiros, melhorarem o metabolismo secundário e promoverem o crescimento das plantas, tornando-as mais aptas a responderem de maneira mais eficiente, permanente e ecológica, ao ataque de patógenos.

Palavras-chave: Bioestimulantes. Compostos naturais. Indução de Resistência. Mancha bacteriana.

ABSTRACT

Tomato cultivation is of great social and economic importance in the country, and is affected by several diseases that can reduce the productivity of this vegetable. Bacterial spot is one of the most devastating diseases in tomato plants grown in hot, humid environments. The disease management is difficult due to the rapid multiplication of pathogens in infected tissues, the absence of suitable chemicals and the absence of tomato varieties with satisfactory resistance. The present study looked for environmentally friendly alternatives in natural compounds for the control of bacterial spot in tomato plants, unraveling the mechanisms of action involved and following the changes in the physiology of treated and inoculated plants. Aloe polysaccharides (AP), tea tree hydrolate (HI) and liquid vermicompost (VL) are natural products extracted from plants or from the decomposition of organic matter, which can act to control *Xanthomonas hortorum* pv. *gardneri* directly, due to the antimicrobial action of the active principles, or indirectly, eliciting the plant defense mechanisms through the resistance induction. Natural compounds can also increase antioxidant system and biostimulate plant growth, making them more resistant to biotic and abiotic stresses. The antimicrobial effect of natural compounds was tested in vitro by inhibiting the formation of microbial biofilm, with HI (50 $\mu\text{L mL}^{-1}$) being responsible for a 57% reduction in bacterial biofilm. The effect on bacterial spot severity was evaluated by spraying the compounds on tomato leaves three days before inoculation with the pathogen. VL (10 mg COT mL^{-1}) was the compound that most reduced the development of symptoms, with the injured leaf area not exceeding 6%, probably due to the antioxidant potential and the contribution of beneficial microorganisms after foliar spraying of this compound. The developmental analysis aimed to compare the increases in shoot and root biomass, as well as the height of plants treated with the compounds. The VL and, surprisingly, the AP promoted the increase of all physiological parameters, confirmed by the increase of the nitrate reductase enzyme, determined in inoculated and non-inoculated plants. To quantify the cell damage caused by oxidative stress and the detoxification potential of plants treated with natural compounds, lipid peroxidation analyzes and quantification and accumulation of hydrogen peroxide were performed. The compound that promoted greater protection against damage to the membranes of inoculated plants was AP, either for its antioxidant or physical protection potential. To evaluate the plant biochemical defense responses, the activities of some antioxidant enzymes such as catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX), and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) were measured. AP and HI promoted significant increases in antioxidant enzymes quickly after inoculation, in addition, plants treated with AP showed high PAL activities, suggesting that plant resistance was induced by the preventive use of these polysaccharides. The humic substances present in the vermicompost were fractionated by acidification of the total humic extract, until obtaining humic acids (HA) and fulvic acids (AF), sprayed on tomato plants. All fractions and extracts reduced disease severity, with the HA fraction being the most bioactive, promoting greater activities of antioxidant and defense enzymes, greater plant growth, greater chlorophyll content, in addition to increasing the efficiency of photosystem II. Thus, the great potential of natural compounds, their extracts and fractions to control bacterial spot in tomato plants, improve secondary metabolism and promote plant growth, making them more apt to respond more efficiently, permanently and ecological, to the pathogens attack.

Keywords: Biostimulants. Natural compounds. Resistance Induction. Bacterial leaf spot.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Ciclo da mancha bacteriana em tomateiros causada por diversas linhagens de *Xanthomonas*. Adaptado de Osdaghi et al. (2021). Florianópolis/SC, 2021..... 8
- Figura 2.** Desenho esquemático dos mecanismos de defesa envolvidos na indução de resistência em tomateiros infectados com *Xanthomonas* spp., desencadeados pela aplicação de compostos naturais. Florianópolis/ SC, 2021 14
- Figura3.** Desenho esquemático das equações gerais da fotossíntese e d respiração 17

CAPÍTULO 2

- Figura 1.** Formação de biofilme bacteriano de *X. hortorum* pv. *gardneri* em confronto com água destilada (controle), polissacarídeos de babosa (PB) a 1, 3 e 5 mg mL⁻¹, hidrolato de melaleuca (HI) a 5, 10 e 50 µL mL⁻¹ e vermicomposto líquido (VL) a 10 mg COT mL⁻¹. Letras diferentes indicam que os valores médios são significativamente diferentes, baseados no teste de Tukey, p< 0,05. Florianópolis/ SC, 2021..... 49
- Figura 2.** Experimento 1 - Severidade da mancha bacteriana em plantas de tomate tratadas com água destilada, polissacarídeos da babosa (PB) a 5 mg/mL, hidrolato de melaleuca (HI) a 50 µl/mL e vermicomposto líquido (VL) a 10 mg COT/mL, inoculadas com *X. hortorum* pv. *gardneri* 3 dias após os tratamentos. A avaliação da doença foi realizada aos 7, 14 e 21 dias após a inoculação. Barras representam o erro padrão das médias. Letras diferentes indicam que os valores médios são significativamente diferentes no mesmo tempo baseados no teste de Tukey, p< 0,05. Florianópolis/SC, 2021 50
- Figura 3.** Desenvolvimento de tomateiros inoculados (A e C) e não inoculados (B e D), previamente tratados com água destilada, polissacarídeos de babosa (PB), hidrolato de melaleuca (HI) e vermicomposto líquido (VL). Massa seca de parte aérea (MSAR), massa seca de raízes (MSR) (A e B) e altura de plantas (C e D) avaliados desde o transplante das mudas até 21 d.a.i. Barras representam o erro padrão das médias. Letras diferentes indicam que os valores médios são significativamente diferentes entre os tratamentos, baseados no teste de Tukey, p< 0,05. Florianópolis/SC, 2021..... 51
- Figura 4.** Peroxidação lipídica representada pelo conteúdo de malondialdeído (MDA) em plantas inoculadas (A) e plantas não inoculadas (B) e quantificação de peróxido de hidrogênio em plantas inoculadas (C) e não inoculadas (D). Os tratamentos foram água destilada,

polissacarídeos de babosa (PB), hidrolato de melaleuca (HI) ou vermicomposto líquido (VL). Material vegetal coletado 12 horas após inoculação. Barras representam o erro padrão das médias. Letras diferentes indicam que os valores médios são significativamente diferentes, baseados no teste de Tukey, $p < 0,05$. Florianópolis/SC, 2021..... 52

Figura 5. Acúmulo de peróxido de hidrogênio (pontos marrons indicado pelas setas) em folíolos destacados de plantas inoculadas e não inoculadas, previamente tratadas com água (controle), vermicomposto líquido (VL), polissacarídeos de babosa (PB) e hidrolato de melaleuca (HI). Material vegetal coletado 12 horas após a inoculação, depositados em solução DAB-HCl 0,3% *overnight* e solução de clareamento por 8 horas. Florianópolis/SC, 2021 .. 53

Figura 6. Atividade da catalase em plantas tratadas com água destilada, polissacarídeos de babosa (PB), hidrolato de melaleuca (HI) e vermicomposto líquido (VL), e inoculadas (A) ou não inoculadas (B) 3 dias depois dos tratamentos. Avaliações feitas antes dos tratamentos (0), antes da inoculação (72), e 84, 96, 120 e 168 horas após os tratamentos. Barras representam o erro padrão das médias. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos no mesmo tempo de avaliação, baseado no teste de Tukey ($p < 0,05$). Seta preta indica momento da inoculação com *Xanthomonas hortorum* pv. *gardneri*. Florianópolis/SC, 2021..... 54

Figura 7. Atividade da ascorbato peroxidase em plantas tratadas com água, polissacarídeos de babosa (PB), hidrolato de melaleuca (HI) e vermicomposto líquido (VL), e inoculadas ou não inoculadas 3 dias depois dos tratamentos. Avaliações feitas antes dos tratamentos (0), antes da inoculação (72), e 84, 96, 120 e 168 horas após os tratamentos. Barras representam o erro padrão das médias. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos no mesmo tempo de avaliação, baseado no teste de Tukey ($p < 0,05$). Seta preta indica momento da inoculação com *Xanthomonas hortorum* pv. *gardneri*. Florianópolis/SC, 2021 54

Figura 8. Atividade da fenilalanina amônia-liase em plantas tratadas com água, polissacarídeos de babosa (PB), hidrolato de melaleuca (HI) e vermicomposto líquido (VL), e inoculadas (A) ou não inoculadas (B) 3 dias depois dos tratamentos. Avaliações feitas antes dos tratamentos (0), antes da inoculação (72), e 84, 96, 120 e 168 horas após os tratamentos. Barras representam o erro padrão das médias. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos no mesmo tempo de avaliação, baseado no teste de Tukey ($p < 0,05$). Seta preta indica momento da inoculação com *Xanthomonas hortorum* pv. *gardneri*. Florianópolis/SC, 2021 55

Figura 9. Atividade da nitrato redutase em plantas tratadas com água, polissacarídeos de babosa (PB), hidrolato de melaleuca (HI) e vermicomposto líquido (VL), e inoculadas (A) ou não inoculadas (B) 3 dias depois dos tratamentos. Avaliações feitas antes dos tratamentos (0), antes da inoculação (72), e 84, 96, 120 e 168 horas após os tratamentos. Barras representam o erro padrão das médias. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos no mesmo tempo de avaliação, baseado no teste de Tukey ($p < 0,05$). Seta preta indica momento da inoculação com *Xanthomonas hortorum* pv. *gardneri*. Florianópolis/SC, 2021 56

Figura Suplementar 1. Experimento 2 - Severidade da mancha bacteriana em plantas de tomate tratadas com água destilada, polissacarídeos da babosa (PB) a 5 mg mL^{-1} , hidrolato de melaleuca (HI) a $50 \text{ } \mu\text{L mL}^{-1}$ e vermicomposto líquido (VL) a $10 \text{ mg COT mL}^{-1}$, inoculadas com *X. hortorum* pv. *gardneri* 3 dias após os tratamentos. A avaliação da doença foi realizada aos 7, 14 e 21 dias após a inoculação. Barras representam o erro padrão das médias. Letras diferentes indicam que os valores médios são significativamente diferentes no mesmo tempo baseados no teste de Tukey, $p < 0,05$. Florianópolis/SC, 2021 67

CAPÍTULO 3

Figura 1. Severidade da mancha bacteriana em plantas de tomate tratadas com água destilada, ácidos húmicos (AH), ácidos fúlvicos (AF), extrato bruto filtrado (EBFIL), extrato bruto não filtrado (EBNFIL) e inoculadas com *X. hortorum* pv. *gardneri* 3 dias após os tratamentos. Barras representam o erro padrão das médias. Letras diferentes indicam que as médias são significativamente diferentes no tempo de avaliação, de acordo com o teste de Tukey, $p < 0,05$. Florianópolis/SC, 2021 80

Figura 2. Atividade da catalase em plantas inoculadas (A) e não inoculadas (B), tratadas com água destilada (controle), ácidos húmicos (AH), ácidos fúlvicos (AF), extrato bruto filtrado (EBF) e extrato bruto não filtrado (EBNF). Barras representam o erro padrão das médias. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos no mesmo tempo de avaliação, baseado no teste de Tukey ($p < 0,05$). A seta preta representa o momento da inoculação com *X. hortorum* pv. *gardneri*. Florianópolis/SC, 2021 80

Figura 3. Atividade da ascorbato peroxidase em plantas inoculadas (A) e não inoculadas (B), tratadas com água destilada (controle), ácidos húmicos (AH), ácidos fúlvicos (AF), extrato bruto filtrado (EBF) e extrato bruto não filtrado (EBNF). Barras representam o erro padrão das médias. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos no mesmo

tempo de avaliação, baseado no teste de Tukey ($p < 0,05$). A seta preta representa o momento da inoculação com *X. hortorum* pv. *gardneri*. Florianópolis/SC, 2021 81

Figura 4. Atividade da fenilalanina amônia-liase em plantas inoculadas (A) e não inoculadas (B), tratadas com água destilada (controle), ácidos húmicos (AH), ácidos fúlvicos (AF), extrato bruto filtrado (EBF) e extrato bruto não filtrado (EBNF). Barras representam o erro padrão das médias. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos no mesmo tempo de avaliação, baseado no teste de Tukey ($p < 0,05$). A seta preta representa o momento da inoculação com *X. hortorum* pv. *gardneri*. Florianópolis/SC, 202182

Figura 5. Atividade da nitrato redutase em plantas inoculadas (A) e não inoculadas (B), tratadas com água destilada (controle), ácidos húmicos (AH), ácidos fúlvicos (AF), extrato bruto filtrado (EBF) e extrato bruto não filtrado (EBNF). Barras representam o erro padrão das médias. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos no mesmo tempo de avaliação, baseado no teste de Tukey ($p < 0,05$). A seta preta representa o momento da inoculação com *X. hortorum* pv. *gardneri*. Florianópolis/SC, 2021 82

Figura 6. Desenvolvimento das plantas de tomates tratadas com água destilada (ÁGUA INOC – plantas inoculadas, ÁGUA NI – plantas não inoculadas), ácidos húmicos (AH), ácidos fúlvicos (AF), extrato bruto filtrado (EBF), extrato bruto não filtrado (EBNF) e inoculadas 3 dias após os tratamentos. Massa seca de parte aérea (MSAR) e massa seca de raízes (MSR) (A). Altura de plantas (B) avaliada desde o transplante até o final do experimento (21 dai). Barras representam o erro padrão das médias. Letras diferentes indicam que as médias são significativamente diferentes entre os tratamentos, de acordo com o teste de Tukey, $p < 0,05$. Florianópolis/SC, 2021 83

Figura 7. Conteúdo de clorofilas a (A), b (B) e carotenoides (C), 12, 24 e 48 horas após aplicação dos tratamentos água destilada, ácidos húmicos (AH), ácidos fúlvicos (AF), extrato bruto filtrado (EBF) e extrato bruto não filtrado (EBNF). Barras representam os erros padrões das médias. Letras diferentes indicam que as médias são significativamente diferentes no tempo de avaliação, de acordo com o teste de Tukey, $p < 0,05$. Florianópolis/SC, 2021 84

Figura 8. Índice SPAD nos tempos 0, 7, 14 e 21 dias após a inoculação nas plantas tratadas com água destilada, ácidos húmicos (AH), ácidos fúlvicos (AF), extrato bruto filtrado (EBF) e extrato bruto não filtrado (EBNF). Barras representam erros padrões das médias. Florianópolis/SC, 2021 85

Figura 9. Fluorescência inicial (A), fluorescência máxima (B) e eficiência do fotossistema II (C), determinadas em folhas tratadas com água destilada, ácidos húmicos (AH), ácidos fúlvicos (AF), extrato bruto filtrado (EBF) e extrato bruto não filtrado (EBNF) e inoculadas 3 dias após tratamentos. Barras representam o erro padrão das médias. Florianópolis/SC, 2021

..... 86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas

AF – Ácido Fúlvico

AH – Ácido Húmico

AJ – ácido jasmônico

APX – Ascorbato Peroxidase

AS – ácido salicílico

BSA – Albumina de soro bovino

CAT – Catalase

Chl – Clorofila

COT – Carbono orgânico total

DAB - Diaminobenzidina

d.a.t. – dias após o tratamento

D.O. – Densidade óptica

d.a.i. – dias após a inoculação

EBF – Extrato Bruto Filtrado

EBNF – Extrato Bruto Não Filtrado

EDTA – Etilenodiamino tetra-acético

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

ET - etileno

FAL – Fenilalanina amônia-liase

F0 – Fluorescência Inicial

Fm – Fluorescência Máxima

Fv – Fluorescência Variável

h.a.t. – horas após tratamentos

HCl – Ácido clorídrico

HI – Hidrolato de Melaleuca

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

H₂SO₄ – Ácido sulfúrico

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

INOC - inoculada

LB – Luria Bertani

MAMP – Padrões Moleculares Associados a Microrganismos

MAPK – *mitogen-activated protein kinase*

MDA – Malondialdeído

MP – membrana plasmática

MSA – Massa Seca da Parte Aérea

MSR – Massa Seca da Raiz

NA – Nutriente ágar

NaNO₂ – Nitrito de Sódio

NaOH – Hidróxido de Sódio

NI – Não Inoculada

PAMP – Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PB – Polissacarídeos de Babosa

pH – Potencial Hidrogeniônico

PSII – Fotossistema II

POD – Peroxidase

PR protein - *pathogenesis-related protein*

PRR – receptores de reconhecimento de padrões

PVPP – Polivinilpirrolidona

RH – resposta de hipersensibilidade

SH – Substâncias Húmicas

T3SS – sistema de secreção tipo III

TBA – Ácido Tiobarbitúrico

TCA – Ácido Tricloroacético

UV – Ultravioleta

Xops – *Xanthomonas outer proteins*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	1
2 OBJETIVOS	4
2.1 OBJETIVO GERAL	4
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
3 CAPÍTULO I - REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1 CULTIVO DO TOMATEIRO	5
3.2 MANCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO	6
3.3 COMPOSTOS NATURAIS E SEUS MODOS DE AÇÃO	9
3.3.1 Óleos essenciais e hidrolatos	10
3.3.2 Polissacarídeos de <i>Aloe vera</i>	11
3.3.3 Vermicomposto líquido	12
3.3.4 Indução de resistência	13
3.3.5 Sistema antioxidante	16
3.4 ASPECTOS FISIOLÓGICOS DE TOMATEIROS INFECTADOS	17
3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
4 CAPÍTULO II - <i>Aloe vera</i>, <i>Melaleuca alternifolia</i> E VERMICOMPOSTO LÍQUIDO PROMOVEM CRESCIMENTO E INDUZEM RESISTÊNCIA À MANCHA BACTERIANA EM TOMATEIROS	37
RESUMO	38
ABSTRACT	39
4.1 INTRODUÇÃO	40
4.2. MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.2.1 Material vegetal e isolado bacteriano	43
4.2.2 Obtenção dos compostos	43
4.2.3 Análise de desenvolvimento	44
4.2.4 Efeito antimicrobiano <i>in vitro</i>	45
4.2.5 Controle da mancha bacteriana em tomateiros	45
4.2.6 Análise da dano celular	46
4.2.7 Análises enzimáticas	46
4.2.7.1 Atividade da ascorbato peroxidase, catalase e fenilalanina amônia-liase	47
4.2.7.2 Atividade da nitrato redutase	47

4.2.7.3 Dosagem de proteínas totais	48
4.2.8 Análises estatísticas	48
4.3 RESULTADOS	48
4.3.1 Efeito antimicrobiano <i>in vitro</i>	48
4.3.2 Controle da mancha bacteriana	49
4.3.3 Análise de desenvolvimento	50
4.3.4 Análise de dano celular	51
4.3.5 Análises enzimáticas	53
4.4 DISCUSSÃO	56
4.5 CONCLUSÕES	60
4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
4.7 MATERIAL SUPLEMENTAR	67

5 CAPÍTULO III - EXTRATOS E FRAÇÕES DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS REDUZEM A SEVERIDADE DA MANCHA BACTERIANA EM TOMATEIROS, MELHORAM O METABOLISMO PRIMÁRIO E ATIVAM O SISTEMA DE DEFESA DAS PLANTAS	68
RESUMO	69
ABSTRACT	70
5.1. INTRODUÇÃO	71
5.2 MATERIAIS E MÉTODOS	74
5.2.1 Material biológico	74
5.2.2 Obtenção e fracionamento das substâncias húmicas	75
5.2.3 Aplicação dos tratamentos e inoculação	75
5.2.3.1 Avaliação da severidade	76
5.2.3.2 Análises enzimáticas	76
5.2.3.3 Análise de desenvolvimento	77
5.2.3.4 Conteúdos de clorofilas e carotenoides	77
5.2.3.5 Teores de pigmentos	78
5.2.3.6 Fluorescência da clorofila a	78
5.2.4 Análises estatísticas	79
5.3 RESULTADOS	79
5.3.1 Controle da mancha bacteriana em tomateiros	79
5.3.2 Atividades enzimáticas	80

5.3.3 Promoção de crescimento	82
5.3.4 Conteúdo de clorofilas e carotenoides	83
5.3.5 Teores de pigmentos	85
5.3.6 Fluorescência da clorofila <i>a</i>	85
5.4 DISCUSSÃO	86
5.5 CONCLUSÃO	90
5.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
6 CONCLUSÕES GERAIS	101
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

1 INTRODUÇÃO GERAL

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das hortaliças mais consumidas no mundo, de grande importância econômica e social, que exige ao longo de sua produção uma adubação constante, mão de obra qualificada e alto nível tecnológico. No Brasil a cadeia produtiva do tomate possui mais de 10 mil produtores, empregando mais de 200 mil pessoas diretamente e outros milhares de forma indireta. O país ocupa o nono lugar a nível mundial e o primeiro na América Latina em termos de produção (DE CARVALHO et al., 2017), tendo atingido em 2017 a soma de 4,3 milhões de toneladas em uma área plantada de 66.191 hectares, com um rendimento de 67.648 quilogramas por hectare (IBGE, 2018). Em Santa Catarina, o polo produtor de tomate se concentra na região do Alto Vale do Rio do Peixe e é responsável pela metade da área cultivada no estado (COSTA et al., 2012). Na Região Sul, temperaturas amenas e altos níveis de umidade favorecem a ocorrência de doenças.

A mancha bacteriana, causada por *Xanthomonas hortorum* pv. *gardneri*, é uma das doenças mais devastadoras em tomateiros cultivados em ambientes quentes e úmidos. Os sintomas ocorrem em toda a parte aérea das plantas, inclusive nos frutos. As manchas aparecem como pequenas lesões marrons irregulares nas folhas mais jovens, e de aparência encharcada nas folhas mais velhas. Doenças bacterianas são de difícil manejo devido à rápida multiplicação dos patógenos nos tecidos infectados e à ausência de produtos químicos adequados para o controle, tornando o tratamento ineficaz após o surto da doença (FRITSCHÉ-NETO; BORÉM, 2012). O controle químico atual é limitado a formulações cúpricas fornecendo apenas um sucesso marginal, visto que muitos isolados já são resistentes a estes produtos (BESTFLEISCH et al., 2015). Além disso, ainda não existem variedades de tomate que confirmam uma resistência satisfatória a essa doença, mesmo porque a diversidade genética da *X. hortorum* pv. *gardneri* é alta e dinâmica.

O desenvolvimento de metodologias e produtos para o manejo e controle alternativo de fungos e bactérias em plantas é uma necessidade da agricultura moderna e busca-se a diminuição do uso de agrotóxicos (TALAMINI; STADNIK, 2004), reduzindo assim as práticas que causam alterações e redução da biodiversidade e da diversidade genética.

Os bioestimulantes possuem potencial para melhorar as respostas imunológicas, induzir a resistência sistêmica das plantas, aumentar o crescimento e o estado metabólico das plantas, tornando-as mais resistentes a estresses bióticos e abióticos (TKALEC et al., 2010; SCHIAVON et al., 2010; BULGARI et al., 2015; OLIVARES et al., 2016;). As substâncias húmicas, extraídas de vermicompostagem e outras matérias orgânicas aumentam a capacidade

de absorção de água e de nutrientes pela planta (MADEJON et al., 2001; ALBIACH et al., 2001; ARANCON et al., 2004), promovem equilíbrio hormonal e a capacidade antioxidante da planta (CHEN; AVIAD, 1990; VARANINI; PINTON, 1995), provocam eliciação da extrusão de ácidos orgânicos no solo, reduzem a toxicidade dos radicais livres, disponibilizando mais energia vital para a planta desenvolver o sistema radicular e parte foliar, conseqüentemente, acelerando a fotossíntese e promovendo o crescimento (CASTRO; VIEIRA, 2001; SILVA et al., 2008). O vermicomposto é rico em nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e magnésio e, quando adicionados ao solo, estimulam o crescimento das plantas pelo aumento do conteúdo de nutrientes (KALE et al., 1992). Além disso, melhoram as propriedades físicas do solo (ALBIACH et al. 2001), melhoram o uso da água, conferem maior proteção contra doenças pela supressão de microrganismos patogênicos (SZCZECH, 1999; BAILEY; LAZAROVITS, 2003, SAHNI et al., 2008), e aumentam a atividade e diversidade biológica (FRACCHIA et al., 2006). Segundo Simsek-Ersahin (2014) os mecanismos de controle de fitopatógenos através da aplicação de vermicompostos incluem antagonismo microbiano, liberação de nutrientes, resistência induzida ao hospedeiro e fatores abióticos de supressão da doença.

Fracionar as substâncias húmicas presentes no vermicomposto permite uma avaliação da fração que mais influencia o desenvolvimento da planta e/ou o controle da doença, quebrando assim a complexidade molecular húmica, isolando moléculas que podem ser identificadas por técnicas analíticas avançadas, como a humeômica (PICCOLO, 2002; NEBBIOSO; PICCOLO, 2011, 2012; NEBBIOSO et al., 2015).

Além das substâncias húmicas, outros compostos naturais, como polissacarídeos e extratos de óleos essenciais, possuem potencial para o controle de doenças em plantas. Poucos são os estudos sobre a aplicação da babosa (*Aloe vera*) no controle de doenças em plantas. Luiz et al. (2012) relataram um aumento significativo na atividade de peroxidase, polifenoloxidase, glucanase, fenilalanina-amônia liase e superóxido dismutase em plantas de tomate, e conseqüente redução da severidade da mancha bacteriana (*X. hortorum* pv. *gardneri*). Luiz et al (2017) demonstraram efeito antimicrobiano dos polissacarídeos de babosa e também seu efeito como indutor de resistência em plantas de morango infectadas por *X. fragariae*.

Os óleos essenciais possuem em sua composição centenas de compostos como alcalóides, terpenos, flavonóides, cumarinas, que atuam diretamente contra o patógeno. Seu custo, sua volatilidade e a alta propensão à fitotoxidez, no entanto, podem inviabilizar seu uso. Assim, uma alternativa é empregar o hidrolato, um subproduto aquoso da extração do óleo

essencial. O uso do hidrolato no controle de doenças foi comprovado por Lozano et al. (2000), através da inibição do desenvolvimento de *Botrytis alli* e *Sclerotium cepivorum* por hidrolatos de alho e cebola. O hidrolato de capim limão foi o que promoveu melhor controle de todas as doenças e insetos em plantações de tomates, dentre outros como melaleuca, menta e erva cidreira (PIMENTEL et al., 2019).

A indução de resistência é uma das alternativas mais efetivas para o controle de patógenos por ativar mecanismos de defesa latentes da planta de várias culturas, que passam a se expressar após a exposição a elicitores bióticos ou abióticos (VAN LOON et al., 1998). O reconhecimento de moléculas elicitoras pela planta faz com que esta reaja mais eficientemente às tentativas de colonização por um patógeno virulento, por estar em um estado de indução, também chamado de condicionamento ou sensibilização (STICHER et al., 1997). As respostas de defesa são um sistema multicomponente desencadeado por moléculas elicitoras que promovem uma maior capacidade defensiva denominada resistência induzida (HAMMERSCHMIDT, 2009). A ativação das defesas da planta não impede o estabelecimento da doença, mas faz com que diminuam as lesões de bactérias, e reduza a esporulação, no caso de ataque das plantas por fungos (STICHER et al., 1997).

Tendo em vista o potencial uso destes compostos naturais no controle de doenças do tomateiro, o presente trabalho buscou avaliar o potencial bioestimulante e indutor de resistência contra mancha bacteriana do tomate dos polissacarídeos da babosa, do hidrolato de melaleuca e do vermicomposto líquido.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial bioestimulante e os modos de ação de compostos naturais no controle da mancha bacteriana em tomateiros.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito dos compostos naturais, seus diferentes extratos e frações, na severidade da mancha bacteriana em tomateiros em casa de vegetação;
- Avaliar o potencial antimicrobiano dos compostos naturais contra a bactéria fitopatogênica *Xanthomonas hortorum* pv. *gardneri*;
- Avaliar a capacidade antioxidante das plantas previamente tratadas com os compostos naturais na redução das EROs;
- Avaliar o desenvolvimento e a atividade de enzimas relacionadas à promoção de crescimento das plantas tratadas com os compostos naturais, posteriormente inoculadas ou não;
- Acompanhar as alterações enzimáticas antioxidantes de plantas previamente tratadas com os compostos naturais e posteriormente inoculadas com o patógeno, ou não inoculadas;
- Acompanhar ao longo do processo de desenvolvimento da mancha bacteriana, as alterações na fluorescência da clorofila a e nos pigmentos fotossintéticos.

3 CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CULTIVO DO TOMATE

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) teve origem no Novo Mundo e todas as espécies selvagens da cultura são provenientes da região andina na América do Sul (ORDÓÑEZ-SANTOS et al., 2009). O centro de domesticação do tomate foi no México, e dali, os acessos de *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* partiram com os espanhóis para a Europa, no século XV. Na Europa, o consumo foi inicialmente lento, pois acreditava-se que o tomate era venenoso devido à cor vermelha (HARVEY et al., 2002). Porém, a seleção e o melhoramento genético resultaram no aumento da popularidade do tomate devido à sua aparência, gosto e valor nutricional. As variedades já selecionadas foram trazidas por imigrantes europeus ao Brasil no século XIX, e o consumo destes frutos foi incrementado após a Primeira Guerra Mundial (NAIKA et al., 2006; ALVARENGA, 2013).

Atualmente o tomate é um dos frutos de hortícolas mais consumidos no mundo e a ingestão do fruto contribui para uma dieta saudável e equilibrada, pois são ricos em minerais, vitaminas, aminoácidos essenciais, açúcares e fibras dietéticas. O tomate contém grandes quantidades de vitaminas B e C, ferro e fósforo (NAIKA et al., 2006) e é consumido tanto *in natura* quanto processado. Para o consumo *in natura* geralmente são utilizados cultivares ou híbridos com crescimento indeterminado, com necessidade de manejo constante como tutoramento, adubação e poda, e para o processamento industrial, são utilizados cultivares de crescimento determinado (NAIKA et al., 2006; ALVARENGA, 2013). O desenvolvimento adequado da planta depende de fatores como a cultivar, luminosidade, temperatura, nutrição, disponibilidade de água e concentração de CO₂ (FILGUEIRA, 2005). Quanto aos fatores climáticos, o tomateiro apresenta faixas de temperaturas ótimas para a germinação, formação de mudas e maturação dos frutos, entre 18 a 24°C. A cultura é muito exigente em água e adubação nas fases de desenvolvimento e produção. A umidade relativa do ar tem efeitos indiretos, principalmente no que diz respeito à multiplicação de fungos e bactérias fitopatogênicas (NAIKA et al., 2006; TAIZ; ZEIGER, 2013).

Segundo a FAO (2019) 130 milhões de toneladas de tomate foram produzidas mundialmente em 2018, sendo 88 milhões *in natura* e 42 milhões para indústria. Entre os maiores produtores estão a China (31%), a Índia (11%) e os Estados Unidos (8%). O Brasil, nono maior produtor mundial, foi responsável por 3,8 milhões de toneladas em 2021, plantando cerca de 64,4 mil hectares (IBGE, 2021). A tomaticultura expressa uma significativa importância econômica no agronegócio brasileiro, visto que movimenta uma

cifra de R\$ 2 bilhões anuais, representando 16% do PIB vindo da produção de hortaliças, sendo os estados de São Paulo e Goiás, os maiores produtores do país (ABCSEM, 2012). A região Sudeste foi responsável por 45% do total produzido, seguida pelo Centro-Oeste, Nordeste e Sul 20,9%, 20,3% e 13,0%, respectivamente. Em Santa Catarina, que representa 4,4% da produção nacional (IBGE, 2021), o polo produtor de tomate se concentra na região do Alto Vale do Rio do Peixe e é responsável pela metade da área cultivada no estado (COSTA et al., 2012).

Na Região Sul do Brasil, somam-se fatores como temperaturas amenas e altos níveis de umidade, características que favorecem a ocorrência de doenças que causam prejuízos significativos, gerando um elevado nível de risco econômico (ALVARENGA, 2013). Grande parte das doenças é controlada a partir de um adequado programa de manejo, integrando o uso de variedades resistentes e a adoção de medidas de exclusão, erradicação e proteção da planta contra agentes fitopatogênicos (KUROZAWA; PAVAN, 2005). As doenças que dizimam os tomateiros podem ser causadas por agentes fúngicos, viróticos, bacterianos, nematoides ou até mesmo doenças fisiológicas, e entre estas doenças, uma das mais devastadoras é a mancha bacteriana, causada pelas bactérias do gênero *Xanthomonas*, com ocorrência em todas as regiões onde o tomateiro é cultivado.

3.2 MANCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO

A mancha bacteriana do tomateiro tem como agentes causais, pelo menos, 4 linhagens dentro de 3 espécies de *Xanthomonas*, sendo considerada uma doença de grande importância para o tomate industrial e de consumo *in natura* no Brasil (QUEZADO-DUVAL, 2003; ITAKO, 2011; ARAÚJO et al., 2017). O gênero *Xanthomonas* pertence ao filo Proteobacteria, à classe Gramma proteobacteria, ordem Xanthomonadales e família Xanthomonadaceae (GARRITY; HOLT, 2000). Atualmente, este gênero é composto por 20 espécies causadoras de doenças em diversas culturas de importância agrônômica, causando danos significativos.

A mancha bacteriana do tomateiro foi inicialmente descrita como cancro do tomateiro por Ethel M. Doidge (1921), identificada como *Xanthomonas vesicatoria* e, posteriormente, como *X. campestris* pv. *vesicatoria* (JONES et al., 2004). Vauterin et al. (1990) e Stall et al. (1994) determinaram dois grupos com diferenças genéticas e fenotípicas, chamando-os de grupo A e grupo B, que mais tarde seriam identificados como *X. axonopodis* e *X. vesicatoria*. Duas outras *Xanthomonas* (grupos C e D) foram isoladas a partir de tomateiros sintomáticos, uma em 1957 por Sutic na Iugoslávia, inicialmente nomeada *Pseudomonas gardneri*, sinônimo de *X. vesicatoria* (DYE, 1966), e a segunda foi isolada EUA, em 1990. Por técnicas

de hibridização de DNA, as estirpes isoladas na Iugoslávia foram identificadas como *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*. As cepas norte americanas geneticamente distintas das demais já identificadas, tiveram a posição taxonômica confirmada após análise na sequência de RNA ribossomal 16S, indicando proximidade filogenética com as *Xanthomonas* (JONES et al., 2004). Jones et al. (2004), após diversos testes de patogenicidade, atividade enzimática, hibridização de DNA, marcadores genéticos, sequências de RNA, reclassificaram as *Xanthomonas* em quatro espécies causadoras da mancha bacteriana no tomateiro, divididas nos grupos A, sendo *X. euvesicatoria*, grupo B *X. vesicatoria*, grupo C *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, e grupo D, *X. gardneri*.

Na região do Alto Vale do Rio do Peixe, em Santa Catarina, espécies de *Xanthomonas* foram isoladas em lavouras de tomate de mesa e determinadas por similaridades de perfis genômicos gerados por BOX-PCR. Entre os 44 isolados bacterianos, 80% foram identificados como *X. gardneri*, 11% como *X. perforans* e 9% como *X. vesicatoria* (COSTA et al., 2012). Recentemente, *X. gardneri*, patógeno mais comum em tomateiros de regiões com clima ameno e úmido (ARAÚJO et al., 2017), foi reclassificada como *X. cynarae* pv. *gardneri*, através de estudos de sequenciamento completo do genoma (TIMILSINA et al., 2019). *X. cynarae* é um sinônimo heterotípico do patógeno de plantações de jardim *X. hortorum*, portanto, este patógeno foi reclassificado como *X. hortorum* pv. *gardneri* (MORINIÈRE et al., 2020). No estudo de Timilsina et al., (2019) também foi confirmado que as *Xanthomonas* possuem alta diversidade e plasticidade genômicas, com frequente transferência horizontal de genes e diversos relatos de evolução e especiação, e esses são alguns dos motivos pelos quais as espécies de *Xanthomonas* foram reclassificadas tantas vezes nos últimos anos.

As xantomonas de manchas bacterianas são patógenos transmitidos por sementes contaminadas, mudas infectadas transplantadas para áreas de produção (POTNIS et al., 2015; SIMONTON et al., 2020), restos culturais que permanecem com o patógeno por um curto período, em plantas daninhas (ZAREI et al., 2018) e plantas voluntárias de tomate que podem ser a ponte de transmissão entre uma safra e outra (SANTOS et al., 2020; STALL et al., 2009). A Figura 1 ilustra o ciclo da mancha bacteriana em tomateiros, em que as condições ambientais (temperatura e umidade), restos de plantas infestadas e sementes infectadas desempenham papéis determinantes na distribuição do patógeno. Fatores como altas densidades de plantas, o uso de irrigação por aspersão, alta umidade e temperaturas facilitam a rápida disseminação durante a produção de mudas ou após o transplante no campo, e podem levar a surtos graves (ABRAHAMIAN et al., 2021). Os sintomas da mancha bacteriana costumam aparecer em 7 dias após a infecção, porém em alguns casos, mais tardiamente,

levando ao plantio definitivo em campo de mudas contaminadas ainda assintomáticas. Depois de estabelecida a doença, não existem opções de controle efetivos e o patógeno se espalha entre as plantas, aumentando ainda mais o inóculo e consequentemente, a severidade da doença.

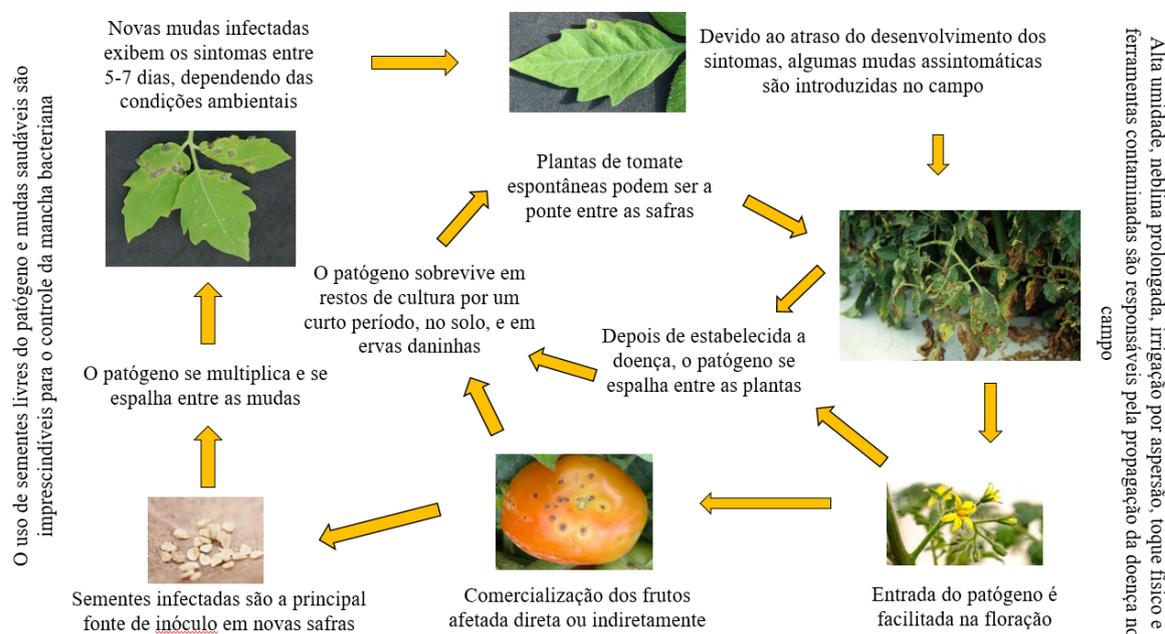


Figura 1. Ciclo da mancha bacteriana em tomateiros causada por diversas linhagens de *Xanthomonas*. Adaptado de Osdaghi et al. (2021).

A mancha bacteriana possui importância mundial e tornou-se um grande problema em campos com plantio de tomateiros irrigados por aspersão. A doença tem potencial de causar perdas significativas devido à baixa eficiência de controle químico e à falta de cultivares com resistência satisfatória, tornando-se importantes fatores limitantes na produção de tomates (QUEZADO-DUVAL et al., 2004; 2014; EMBRAPA, 2012; POTNIS et al., 2015; SIMONTON et al., 2020; ABRAHAMIAN et al., 2021). As variedades de tomate predominantes no mercado são híbridas importadas com baixo grau de resistência às espécies e raças de *Xanthomonas* (VIEGAS, 2016).

Atualmente, as opções de controle da mancha bacteriana são: a) formulações cúpricas com risco de fitotoxicidade, e problemas com o acúmulo e resíduo de cobre no solo, nas plantas e nos frutos (MOSS et al., 2007; ITAKO, 2011); b) antibióticos (estreptomicina e oxitetraciclina) que fornecerem apenas um sucesso marginal, visto que muitos isolados bacterianos já são resistentes a estes produtos (BESTFLEISCH et al., 2015; LOPES; QUEZADO-SOARES, 1999; MCMANUS; STOCKWELL, 2000; ITAKO, 2011); c) a molécula acibenzolar-S-metil, ingrediente do produto BION®, caracterizado como ativador

de planta (QUEZADO-DUVAL, 2006; ROMEIRO, 2008) e classificado como fungicida, com toxicidade moderada; d) cloreto de benzalcônio (Fegatex®), classificado como bactericida, corrosivo; e) óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (Timorex Gold®); f) laminarina, polissacarídeo extraído da alga *Laminaria digitata*, classificado como fungicida bioquímico; g) *Bacillus subtilis* linhagem QST 713, registrado como bactericida microbiológico. Todas os citados acima são princípios ativos e produtos registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para o controle da mancha bacteriana em tomateiros, porém, com eficiência variável (AGROFIT, 2021; BETTIOL; MORANDI, 2009; ITAKO et al. 2012; NASCIMENTO et al., 2013).

O desenvolvimento de metodologias e produtos para o manejo e controle alternativo de bactérias em plantas é uma necessidade da agricultura moderna e o que se busca é a diminuição da utilização de agrotóxicos (TALAMINI; STADNIK, 2004), evitando a redução da biodiversidade e da diversidade genética. Além disso, é evidente a necessidade de opções de produtos eficazes no controle de doenças para agricultores familiares, orgânicos e agroecológicos, permitindo que estes preparem as soluções naturais em suas propriedades, com baixo custo e que não agridam a saúde do solo, das plantas, dos animais e a saúde humana.

Como alternativas sustentáveis para o manejo integrado da mancha bacteriana destacam-se o controle biológico, a utilização de variedades resistentes, o uso de compostos naturais que não agridam o meio ambiente e a indução de resistência (BURKETOVA et al., 2015).

3.3 COMPOSTOS NATURAIS E SEUS MODOS DE AÇÃO NO CONTROLE DA MANCHA BACTERIANA

Os compostos naturais são substâncias de origem vegetal e animal que modulam o crescimento e estão envolvidos nas respostas de defesa das plantas, além de atuarem, muitas vezes, diretamente contra o patógeno. Os modos de ação desses compostos naturais no controle de doenças e na promoção de crescimento são variados, sinérgicos e/ou complementares. Os efeitos dos compostos no patógeno são versáteis, podendo matar ou limitar seu crescimento, bem como induzir reações de defesa das plantas através do reconhecimento de moléculas elicitoras. Segundo Schwan-Estrada e Stangarlin (2005) e Schwan-Estrada (2002), a exploração da atividade biológica de compostos secundários, presentes no extrato bruto, nos polissacarídeos ou em óleos essenciais de plantas medicinais, pode representar grande potencial de controle alternativo de doenças em plantas cultivadas,

principalmente pelo fato de muitos extratos possuírem um efeito antimicrobiano e indutor de resistência.

3.3.1 Óleos essenciais e hidrolatos

Os óleos essenciais, compostos naturais produzidos por plantas aromáticas, são metabólitos secundários com potencial antioxidante e antimicrobiano. Dentre os óleos essenciais testados em estudos de controle de doenças em plantas pode-se destacar os derivados da *Melaleuca alternifolia*, planta nativa australiana popularmente conhecida como árvore de chá (*tea tree*) ou melaleuca. Estudos recentes demonstraram que o óleo de *tea tree*, e principalmente, os seus hidrocarbonetos aromáticos voláteis, possuem atividade antifúngica, antibacteriana, antiviral e indutora de resistência contra microrganismos fitopatogênicos como *Rhizopus stolonifer*, *Tobacco mosaic virus*, *Botrytis* sp., *X. fragariae* e *X. hortorum* pv. *gardneri*. Seus efeitos fungicidas/fungistáticos foram avaliados *in vitro*, e os mecanismos de ação investigados mostraram extravasamento de DNA, proteína e glicose, dano lipídico, acúmulo de espécies reativas de oxigênio e atividade antioxidante. *In vivo*, as atividades antimicrobianas foram avaliadas em maçãs, tomateiros e morangueiros e revelaram baixo potencial no controle de manchas bacterianas e fúngicas, indicando diferentes interações entre o óleo essencial e o ambiente, que podem reduzir suas atividades antimicrobianas (LUIZ et al., 2012, 2017; DA ROCHA NETO et al., 2019).

O alto custo, a volatilidade e o potencial de fitotoxidez inviabilizam o uso dos óleos essenciais e abrem precedentes para o uso do hidrolato, um sub-produto aquoso da extração do óleo, que permanece com 0,02 a 0,5 mg mL⁻¹ dos princípios ativos do óleo essencial em sua composição (FRANZNER et al., 2007). A produção de hidrolato é da ordem de 80 vezes o peso do óleo essencial obtido em cada destilação, melhorando o custo benefício em relação ao óleo essencial (PIMENTEL et al., 2019).

O potencial do hidrolato no controle de doenças já foi relatado pela inibição no desenvolvimento de *Botrytis alli* e *Sclerotium cepivorum* por hidrolatos de alho e cebola (LOZANO et al., 2000), pela inibição do crescimento da bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, pela elicitação de fitoalexinas (FRANZNER et al. 2007), entre outros. Em um estudo de campo com plantas de tomate das variedades Campestre, Norte e Cerejinha, foram testados diversos hidrolatos no controle de doenças e pragas. Entre os hidrolatos de capim limão, melaleuca, menta e erva cidreira, o hidrolato de capim limão foi o que promoveu melhor controle de todas as doenças e insetos em plantações de tomates, as quais permaneceram sadias desde o transplante até a colheita (PIMENTEL et al., 2019).

3.3.2 Polissacarídeos de *Aloe vera*

A babosa, ou *Aloe vera* (L.) Burm, também conhecida como *Aloe barbadensis*, pertencente à família Liliaceae, é nativa do continente africano e adaptada a diversas regiões do Brasil. Neste país é popularmente utilizada na cicatrização de feridas, no tratamento de queimaduras, conjuntivite, dores reumáticas dentre outros males (ALONSO, 2007; GUERRA et al., 2008).

A babosa contém folhas lanceoladas e espessas, com uma grande quantidade de mucilagem e parênquima de reserva. O parênquima de reserva contém alto conteúdo de água, cerca de 98,5% a 99,5% do peso fresco. Uma diversidade de substâncias está presente no parênquima de reserva de espécies do gênero *Aloe*, sendo os polissacarídeos os compostos majoritários atingindo 60% do remanescente sólido (FEMENIA et al., 1999), com teores proeminentes de glucose e ácido málico (DIEHL; TEICHMULLER, 1998). Dos polissacarídeos presentes, a acemanana vem sendo estudada pelo seu potencial antimicrobiano. A acemanana é um polímero misto de mananas acetiladas, com cadeias de tamanhos variados, formadas por resíduos de manose e glucose unidos por ligações do tipo β -(1 \rightarrow 4) e com peso molecular de aproximadamente 1000 KDa (TURNER et al., 2004). A concentração de acemanana pode ser muito variável (REYNOLDS; DWECK, 1999) e é influenciada pelas mudanças sazonais, irrigação e/ou pela localização geográfica dos cultivos (NI et al., 2004).

Na indústria farmacêutica, a babosa já teve comprovados os seus potenciais antineoplásicos, antimicrobianos, anti-inflamatórios (YAGI et al., 2002), antioxidantes (YAGI et al., 2003) e antifúngicos (LEE et al., 2001) para doenças em humanos. Além dos polissacarídeos, mais de 75 ingredientes ativos como enzimas, vitaminas, lignina, flavonoides, aminoácidos e ácido salicílico (FEMENIA et al., 1999; CHOI; CHUNG, 2003; HABEEB et al., 2007; PANDEY; MISHRA, 2010) podem auxiliar no controle de doenças.

Poucos são os estudos que avaliaram o potencial da babosa no controle de doenças em plantas, mas já foi relatado que os polissacarídeos da babosa ativam as respostas de defesa das plantas, induzindo a resistência de morangueiros e tomateiros contra diferentes espécies de *Xanthomonas* (LUIZ et al., 2012; 2017). O potencial antimicrobiano da babosa já foi comprovado em ensaios *in vitro* contra fungos e bactérias, como *Penicillium digitatum*, *P. expansum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Xanthomonas fragariae* e *X. gardneri* (SAKS; BARKAY-GOLAN, 1995; KANG et al., 2014; LUIZ et al., 2012; 2017). Jasso de Rodríguez et al. (2005) verificaram a eficiência da fração líquida e do gel da babosa (ambos pasteurizados) na inibição do crescimento de *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* e

Colletotrichum coccodes, isolados de batatas. Para os dois tipos de frações de Aloe, as atividades foram semelhantes. O gel ($10^4 \mu\text{L}^{-1}$) mostrou efeito inibitório contra *F. oxysporum* por um longo período. A fração líquida ($10^5 \mu\text{L}^{-1}$) reduziu a taxa de crescimento da colônia em *R. solani*, *F. oxysporum* e *C. coccodes*, sendo este o primeiro relato de qualquer atividade da fração líquida da Aloe contra fungos patogênicos de plantas.

3.3.3 Vermicomposto líquido

O vermicomposto é derivado da decomposição física, química e biológica de restos de alimentos, folhas secas, serragem, com a ajuda de minhocas, que aceleram o processo de decomposição e humificação, resultando em um composto sólido, ou vermicomposto, bem como, um composto líquido, também chamado de chorume, ou chá de vermicomposto. Este extrato aquoso deve passar pela maturação, ou seja, deve ficar exposto ao sol por, pelo menos, 60 dias (AGUIAR et al., 2013; BALDOTTO et al., 2014), para que se completem as atividades biológicas e químicas e se tenha um composto líquido estável. A estabilidade do vermicomposto líquido confere maior quantidade de macro e micronutrientes e promotores de crescimento, maior capacidade de retenção de água, menor risco de fitotoxidez para as plantas, maior bioatividade na promoção de crescimento e produtividade de diversas culturas como milho (KMET'OVÁ; KOVÁČIK, 2014), trigo (YOUSEFI; SADEGHI, 2014), hortelã-pimenta (AYYOBI et al., 2014), tomates (ZUCCO et al., 2015), pimentão (REKHA et al., 2018) e alho (GICHABA et al., 2020). Além disso, um vermicomposto líquido estabilizado confere maior eficiência na supressão de doenças em plantas através da maior quantidade de compostos fenólicos, da quantidade e diversidade de microrganismos benéficos, tanto no solo quanto nas folhas (KHATTIYAPHUTTHIMET et al., 2020; ARANCON; EDWARDS, 2004; ARANCON et al., 2020).

A severidade da mancha bacteriana pode ser influenciada pelo nível de concentração de nutrientes no solo e nas folhas, afetando a expressão de genes de resistência a doenças de plantas na via de resistência adquirida sistêmica (SAR) (DUTTA et al., 2017). O modo de ação do vermicomposto líquido para a inibição de doenças não é bem conhecido, mas alguns estudos têm relatado que as propriedades físico-químicas dos nutrientes e das substâncias húmicas presentes no vermicomposto líquido podem melhorar o conteúdo nutricional das plantas, induzir resistência sistêmica contra o patógeno e / ou ser diretamente tóxicas para o patógeno vegetal (KONE et al., 2010). Outros estudos relatam que o vermicomposto na superfície das folhas favorece o crescimento de micróbios benéficos, atuando assim como um agente de biocontrole de patógenos (DIANEZ et al., 2007).

As substâncias húmicas (SH) são conhecidas como bioestimulantes e, por definição, melhoram a eficiência nutricional das plantas, as respostas aos estresses abióticos e a produtividade e qualidade dos cultivos (DU JARDIN, 2015). Além disso, as SH também atuam no metabolismo secundário por diversos mecanismos de ação como: promoverem o equilíbrio hormonal e a capacidade antioxidante da planta (GRATÃO et al., 2005; SCHIAVON et al., 2010; PIZZEGHELLO et al., 2001; GARCÍA et al., 2014), reduzirem a toxicidade dos radicais livres (CASTRO; VIEIRA, 2001; SILVA et al., 2008), promoverem o antagonismo microbiano (BALDOTTO et al., 2007), induzirem a resistência do hospedeiro (SCHIAVON et al., 2010; OLIVARES, et al., 2015) e estimularem fatores abióticos de supressão da doença (SIMSEK-ERSAHIN, 2014; CANELLAS et al., 2008; PUGLISI et al., 2008).

A Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS, 2014) propõe o fracionamento químico das SH, o qual, por sua vez, leva à definição operacional para as frações que compõem as substâncias húmicas (ácidos fúlvicos, ácidos húmicos, huminas). O fracionamento é baseado nas características de solubilidade das substâncias húmicas e encontra-se detalhadamente descrito na página da Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS, 2014) e em Benites et al. (2003).

Após o fracionamento químico, os ácidos húmicos e fúlvicos constituem as duas substâncias húmicas mais estudadas. As composições química e de grupos funcionais médias dos ácidos húmicos e dos ácidos fúlvicos (SCHNITZER; KHAN, 1972) revelam que os ácidos húmicos apresentam mais C e menos O que os ácidos fúlvicos, mostrando que o ácido húmico é relativamente mais polimerizado que o ácido fúlvico e que os ácidos fúlvicos contêm mais grupamentos funcionais ácidos, por unidade de massa, que os ácidos húmicos. A relação entre as frações ácidos húmicos e ácidos fúlvicos, por exemplo, constitui-se num índice de estabilidade da matéria orgânica (BALDOTTO, 2006; RIBAS et al., 2008). Esses efeitos das substâncias húmicas, em especial da fração bioativa dos ácidos húmicos, vêm despertando o interesse de produtores rurais e de empresas para uso no manejo de sistemas agrários (BALDOTTO et al., 2014).

3.3.4 Indução de resistência

A ativação das defesas naturais das plantas vem sendo constantemente estudada, podendo ser sistêmica, persistente e atuar contra um amplo espectro de patógenos (PASCHOLATI; TOFFANO, 2007). A indução de resistência envolve a ativação de mecanismos de defesa latentes da planta, que passam a se expressar após a exposição a

elicitores bióticos ou abióticos (VAN LOON et al., 1998), levando a planta a um estado de indução, também chamado de condicionamento ou sensibilização (STICHER et al., 1997). Um agente para ser considerado elicitor não deve apresentar efeito direto sobre o patógeno, deve promover respostas de defesa da planta necessariamente após um intervalo de tempo da aplicação, promover proteção a um amplo espectro de patógenos e não apresentar relação entre efeito e doses do indutor (STEINER; SCHÖNBECK; 1995). Os elicitores podem ser bióticos ou abióticos, e nos compostos naturais, podemos encontrar moléculas elicitoras das duas naturezas, atuando de maneira complementar e/ou sinérgica.

Quando plantas são previamente expostas a um elicitor, suas células e tecidos reagem mais rapidamente às tentativas de colonização por um patógeno (ROMEIRO; GARCIA, 2009), conforme representado no desenho esquemático abaixo (Figura 2).

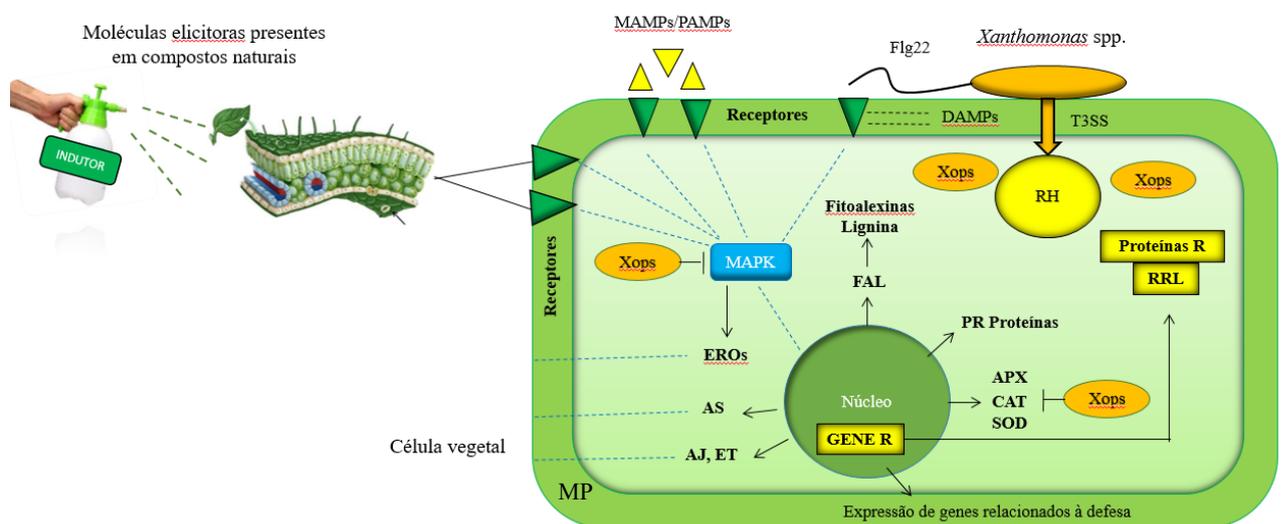


Figura 2. Desenho esquemático dos mecanismos de defesa envolvidos na indução de resistência em tomateiros infectados com *Xanthomonas* spp., desencadeados pela aplicação de compostos naturais. Legenda: MAMPs/PAMPs/ DAMPs: padrões moleculares associados a microrganismos/ patógenos/ danos; PRR: receptores de reconhecimento de padrões; MAPK: *mitogen-activated protein kinase*; EROs: espécies reativas de oxigênio; T3SS: sistema de secreção tipo III; Xops: *Xanthomonas outer proteins*; RH: reação de hipersensibilidade; FAL: fenilalanina amônia-liase; proteínas R: proteínas de resistência; PR proteínas: proteínas relacionadas à patogênese; APX: ascorbato peroxidase; CAT: catalase; SOD: superóxido dismutase; AS, AJ, ET: ácido salicílico, á. jasmônico e etileno;; RRL: repetições ricas em leucina; RH: reação de hipersensibilidade; Gene R: genes de resistência; Proteínas R: proteínas de resistência; MP: membrana plasmática.

Assim como as moléculas elicitoras, os padrões moleculares associados a microrganismos (MAMPs), a patógenos (PAMPs) ou a danos (DAMP) são reconhecidos por PRRs (receptores de reconhecimento de padrões) na membrana plasmática (MP) das células do hospedeiro (CONRATH, 2011) (Figura 2).

A interação entre um elicitor e um receptor resulta em uma sinalização em cascata, que pode percorrer o espaço intracelular até o núcleo, ou o espaço intercelular de maneira sistêmica. De acordo com Shah et al. (2014), diferentes rotas metabólicas podem ser ativadas dependendo do estímulo inicial. Geralmente ocorre a ativação da rota via ácido salicílico (AS) em resposta à infecção por patógenos biotróficos ou hemibiotróficos, enquanto que para patógenos necrotróficos são ativadas rotas dependentes de etileno (ET) ou ácido jasmônico (AJ) (THAKUR; SOHAL, 2013).

A imunidade ativada por moléculas de MAMP / PAMP é a primeira linha de defesa local, chamada de PTI (*Pathogens Triggered Immunity*). Essa reação de defesa restringe o crescimento do patógeno e pode levar à resistência sistêmica induzida (RSI) ou resistência sistêmica adquirida (RSA), tornando a planta menos suscetível ao ataque subsequente de patógenos.

Alguns patógenos superam essa primeira linha de defesa da planta e conseguem penetrar na célula vegetal por meio do sistema de secreção tipo III (T3SS), injetando proteínas de avirulência, como as Xops (*Xanthomonas outer proteins*), que impedem ou atrasam as respostas de defesa da planta. O reconhecimento desses efetores no citoplasma por nucleotídeos ligados a repetições ricas em leucina (LRR) desencadeia a resposta hipersensitiva (RH), que programa rapidamente a morte celular, o que pode representar uma forte resistência, garantindo um obstáculo à proliferação de patógenos biotróficos e hemibiotróficos. Assim, forma-se a segunda camada de imunidade ativa da planta, chamada de imunidade desencadeada por efetores (ETI – *Immunity Triggered by Effectors*).

O núcleo da célula inicia uma massiva transcrição de genes de resistência (gene R), codificando proteínas relacionadas à patogênese (*PR protein*), aumentando a atividade de enzimas antioxidantes e de defesa como a fenilalanina amônia-liase (FAL), lipoxigenases, peroxidases, quitinases e β -1,3-glucanases. A FAL é a primeira enzima da rota dos fenilpropanoides e suas altas atividades, induzidas por elicitores ou pelo ataque do patógeno, aumentam a síntese de compostos fenólicos, fitoalexinas e lignina nos tecidos do hospedeiro, como mais uma tentativa de conter o avanço do patógeno.

A indução de resistência permite que as plantas ativem um conjunto adequado de defesas para cada tipo de patógeno, evitando o uso indevido de recursos e protegendo contra vários tipos de inimigos. O tempo necessário para implementar a resposta pode significar que as plantas estão sujeitas a danos consideráveis antes que a resposta adequada atue. Logo, mesmo uma planta estando em estado de alerta, muitas vezes o sistema de defesa não consegue impedir o estabelecimento da doença e o desenvolvimento dos sintomas, mas estes ocorrem

mais tardiamente e com lesões menores, resultando em menor severidade da doença e menores perdas econômicas causadas pela doença na cultura (FROST et al., 2008).

3.3.5 Sistema antioxidante

As plantas que sofrem estresses bióticos ou abióticos aumentam as concentrações de espécies reativas de oxigênio (EROs) em seus tecidos. Os processos metabólicos dependentes do oxigênio, como a respiração aeróbica, fotossíntese e fotorrespiração, também levam à produção de EROs em mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos, respectivamente. O estresse oxidativo pode ser medido pela quantidade de espécies reativas presentes na célula, como os radicais hidroxila (OH^\cdot), o superóxido (O^{2-}), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singlete (O_2). Quando sob estresse ambiental e o equilíbrio entre a produção de EROS e a atividade antioxidante é rompido a favor dos compostos oxidantes, ocorrem danos oxidativos nas estruturas celulares (KIM; KWAK, 2010).

As plantas desenvolveram mecanismos de defesa enzimáticos e não enzimáticos capazes de neutralizar a citotoxicidade das EROs, atuando no local exato e na intensidade adequada, possibilitando a reparação de danos como a recuperação da eficiência fotossintética da planta. As respostas do sistema antioxidante iniciam a partir da ativação das proteínas kinases ativadas pelo mitogênio (MAPK), aumentando a produção de EROs (Figura 2) (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008; BECKER; SPOEL, 2006). Em baixas concentrações, as EROs atuam como sinalizadoras de estresse para as células vizinhas, mas em grandes quantidades, elas têm efeito tóxico agindo diretamente sobre as estruturas do patógeno, além de se acumularem no sítio de infecção restringindo o desenvolvimento da lesão, pela reação de hipersensibilidade (RH).

O H_2O_2 também atua como sinalizador, aumentando a atividade da enzima benzoico 2-hidrolase, precursora na síntese do ácido salicílico (hormônio crucial na sinalização da RSA) (LEHMANN et al., 2015). O peróxido é uma espécie moderadamente reativa, com uma meia-vida relativamente longa e tamanho reduzido, características que permitem maior penetração em membranas celulares e migração para diferentes locais, atuando em regiões distantes do local em que foi produzido, por isso é tão importante nos processos de sinalização em condições de estresse (BARBOSA et al., 2014).

Por serem moléculas altamente reativas, quando em altas concentrações na célula vegetal, as EROs reagem com lipídios presentes nas membranas plasmática e de organelas, causando a peroxidação lipídica. Como consequência ocorre o extravasamento do conteúdo celular, formação de novos radicais lipídicos reativos, formação de resíduos químicos (como

o malondialdeído, MDA), comprometendo moléculas importantes como os pigmentos fotossintéticos, proteínas, ácidos nucleicos e componentes da matriz extracelular (FOYER et al., 1997; KRUSE et al., 2006).

O sistema antioxidante das plantas pode ser não enzimático composto pelo ascorbato (AsA), a glutatona (GSH), o α -tocoferol e os carotenoides. Esses antioxidantes podem evitar a formação de radicais livres, sequestrá-los ou promover sua degradação, prevenindo a ocorrência de danos às células das plantas (SERKEDJIEVA, 2011). O sistema antioxidante enzimático envolve a superóxido dismutase (SOD), catalases (CAT), peroxidases (POD), glutatona peroxidase (GPX), ascorbato peroxidase (APX), glutatona redutase (GR) e a glutatona S-transferase (GST). Estas enzimas estão distribuídas espacialmente nas células da planta hospedeira em cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos, e têm suas atividades aumentadas em momentos distintos após a infecção de um patógeno, todas com o objetivo de diminuir a reatividade das EROs nas células infectadas (SCANDALIOS, 2005; KIM; KWAK, 2010; DINAKAR et al., 2012; NOCTOR et al., 2015; LEHMANN et al., 2015). A regulação da expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes, cuja atividade evita ou reduz os danos potenciais causados pelas EROs, faz parte da resposta ao estresse da infecção do patógeno (CYRNE et al., 2003).

3.4 ASPECTOS FISIOLÓGICOS DE TOMATEIROS INFECTADOS

As plantas crescem, se desenvolvem e produzem frutos graças ao processo fotossintético, representado pela equação geral da fotossíntese abaixo (Figura 3).

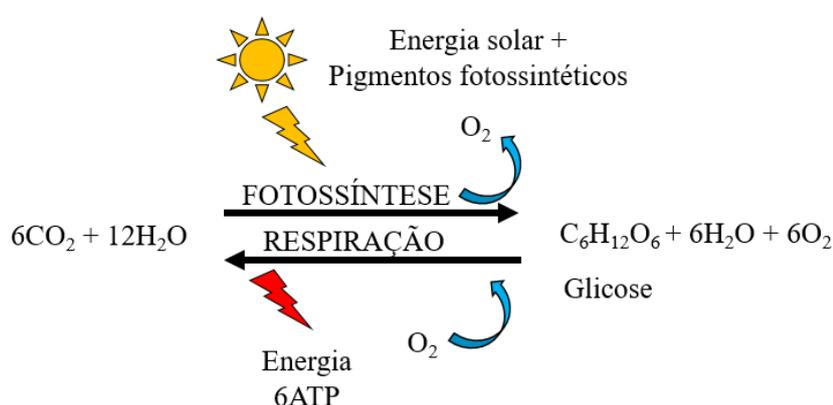


Figura 3. Desenho esquemático das equações gerais da fotossíntese e da respiração.

Em uma planta saudável, quanto maior a área foliar fotossinteticamente ativa, o teor de pigmentos fotossintéticos e a capacidade assimilatória em sintetizar e alocar os

fotoassimilados, maior é o aproveitamento da energia solar, maior a síntese de compostos orgânicos, seu desenvolvimento e seus ganhos de produtividade (REIS et al., 2013; RODRIGUES et al., 2016).

A mancha bacteriana causada por espécies de *Xanthomonas* é uma das doenças mais devastadoras que acomete plantas de tomate. Esta doença tem como sintomas iniciais pequenas manchas marrons irregulares, geralmente envolto por um halo clorótico, que evoluem para grandes áreas foliares lesionadas, com aspecto encharcado, e em ataques mais severos do patógeno, ocorre o desfolhamento e desproteção dos frutos. Todas as partes verdes aéreas da planta são afetadas, mas as folhas mais velhas da planta costumam ser as mais atacadas.

A diminuição da área fotossintética da planta devido às lesões necróticas ou pelo desfolhamento, compromete aspectos fisiológicos da planta, principalmente aqueles relacionadas às taxas de fotossíntese e respiração, absorção e assimilação de nutrientes e água. Em tecidos doentes a taxa de respiração aumenta enquanto que a taxa de fotossíntese tende a diminuir. Desta forma, para se obter maior desenvolvimento e maior produção de frutos em uma planta, é necessário aumentar a fotossíntese líquida através do aumento da fotossíntese bruta e redução da respiração (KLUGE et al., 2014).

Plantas infectadas com manchas bacterianas sofrem alterações nos mecanismos de absorção e assimilação de carbono, absorção de nutrientes e água, abertura e fechamento de estômatos com conseqüente diminuição na condutância estomática, diminuição da absorção da radiação solar, redução ou destruição de clorofila (clorose) ou de cloroplastos (amarelecimento), inibição de enzimas do ciclo de calvin (rubisco), inibição na cadeia transportadora de elétrons e aumento das taxas de respiração (BASSANEZI et al., 2002; DALIO et al., 2014). Essas alterações desequilibram as reações fotossintéticas que acabam causando danos ao aparato fotossintético. A planta reflete este dano por meio da concentração de pigmentos ou pela maior emissão de fluorescência da clorofila a (BRESTIC; ZIVCAK, 2013).

A avaliação da fluorescência da clorofila a é uma técnica não destrutiva que permite a análise qualitativa e quantitativa da absorção e aproveitamento da energia luminosa pelo aparato fotossintético, revelando a saúde e eficiência dos fotossistemas I e II (PSI e PSII) em um determinado momento (KRAUSE; WEIS, 1991), além de permitir avaliar a taxa de transporte de elétrons (ETR) entre os centros de reação.

A eficiência fotossintética de uma planta está fortemente associada à quantidade de clorofilas presentes no tecido foliar. De acordo com Rodrigues et al. (2016) o aumento nos

teores de clorofilas resulta em maior absorção da luz solar e como resultado, ocorre maior transporte de elétrons nos fotossistemas durante a fase fotoquímica da fotossíntese. A absorção da luz ocorre nos PSI e PSII, sendo estes constituídos de pigmentos fotossintéticos como as clorofilas a e b que estão presentes nas membranas dos tilacóides (CASIERRA-POSADA; PEÑA-OLMOS, 2015). A absorção desta energia causa uma instabilidade na molécula de clorofila, tornando-a excitada. Uma vez na forma instável, a clorofila precisa retornar ao seu estado basal de energia e para isto precisa dissipar esta energia na forma de calor e/ou como fluorescência e/ou utilizando nas reações fotoquímicas (CAMPBELL; FARRELL, 2006).

Aproximadamente 90% da massa seca de uma planta é formada a partir dos fotoassimilados, portanto, a planta utiliza uma parte do que produz para crescer, convertendo em biomassa, e outra parte oxida na respiração como fonte de energia para seu metabolismo. A fotossíntese líquida (fotossíntese bruta menos a respiração) é um indicador da eficiência fotossintética das plantas em assimilar o CO₂ e converter em compostos orgânicos (POPOV et al., 2003). Aumentos na biomassa aérea e das raízes e altura de plantas normalmente são parâmetro utilizados para acompanhar o desenvolvimento de plantas e o possível bioestímulo, ou, pelo contrário, o retardo no crescimento.

Os parâmetros de desenvolvimento das plantas pode ser correlacionadas aos aumentos de atividades de enzimas como a nitrato redutase (NR), envolvida na absorção de nitrato e redução em nitrito, para posterior biossíntese de aminoácidos, proteínas, moléculas de clorofila e ácidos nucleicos (TAIZ; ZEIGER, 2013). Por isso, altas atividades da NR estão relacionadas a altas produtividades nas culturas, uma vez que esta é a enzima chave na regulação do metabolismo do nitrogênio (N), elemento mineral essencial por ser um dos principais componentes da biomassa das plantas (VIANA; KIEHL, 2010).

Outro fator que pode influenciar o desenvolvimento das plantas é o ataque de patógenos, e isso pode causar um redirecionamento de N do metabolismo primário para o centro de defesa da planta (metabolismo secundário) (MUR et al., 2016). Nesse caso ocorre a redução de enzimas como a NR e a glutamina sintetase (GS), para favorecer as atividades de enzimas como a glutamato desidrogenase (GDH), associada à morte celular que ocorre como resultado de respostas de resistência e desenvolvimento da doença. Os genes que codificam NR e GS, por exemplo, atuam como genes de defesa metabólica, remobilizando o N para longe do local da infecção e reaproveitamento do N em mecanismos de defesa (PAGEAU et al., 2006; TAVERNIER et al., 2007).

A aplicação de compostos naturais em plantas de maneira preventiva ao ataque de patógenos é uma solução alternativa e ecologicamente viável, visto que eles podem ser fonte de microrganismos benéficos e promotores de crescimento, podem ativar enzimas envolvidas na assimilação de nitrato e sua incorporação nas moléculas vitais da planta, podem aumentar a eficiência de assimilação de CO₂, elevar as taxa fotossintéticas e reduzir as taxas respiratórias. Outro efeito promissor dos compostos naturais pode ser a redução na produção de etileno, que retarda a senescência das folhas, aumentando o período que a planta permanece com a fotossíntese ativa, também chamado de efeito verde (TÖFOLI; DOMINGUES, 2007; FAGAN et al., 2010), repercutindo conseqüentemente em aumentos significativos no rendimento das culturas.

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAMIAN, P., SHARMA, A., JONES, J.; VALLAD, G.E. Dynamics and spread of bacterial spot epidemics in tomato transplants grown for field production. **Plant Disease**, 105, 566–575. 2021.

AGROFIT. **Departamento de Defesa e Inspeção Vegetal. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.** Agrofit online. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/agrofit/>. Acessado em 11 de agosto de 2021.

AGUIAR, N.O., OLIVARES, F.L., NOVOTNY, E.H. et al. Bioactivity of humic acids isolated from vermicomposts at different maturation stages. **Plant Soil** 362, 161–174. 2013. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1277-5>

ALBIACH, R., CANET, R., POMARES, F., INGELMO, F. Organic matter components, aggregate stability and biological activity in a horticultural soil fertilized with different rates of two sewage sludges during ten years. **Bioresour. Technol.** 77, 109–114. 2001.

ALVARENGA, M. A. R. Tomate: produção em campo, casa de vegetação e hidroponia. 2ed., Lavras: UFLA, 2013. 455p.

ARANCON, N.Q., EDWARDS, C.A., BIERMAN, P., WELCH, C., METZGER, J.D. Influences of vermicomposts on field strawberries: 1. Effects on growth and yields. **Bioresour. Technol.** 93, 145–153. 2004.

ARANCON, N.Q.; EDWARDS, C.A. **Vermicomposts can suppress plant pest and disease attacks.** Biocycle. 2004

ARANCON, N.; CLEAVE, J.V., HAMASAKI, R.; NAGATA, K.; FELTS, J. The influence of vermicompost water extracts on growth of plants propagated by cuttings. **J Plant Nutr** 43:176–185. 2020. <https://doi.org/10.1080/01904167.2019.1659355>

ARAÚJO, E.R., PEREIRA, R.C., MOITA, A.W., FERREIRA, M.A.S.V., CAFÉ-FIHO, A.C. and QUEZADO-DUVAL, A.M. Effect of temperature on pathogenicity components of tomato bacterial spot and competition between *Xanthomonas perforans* and *X. gardneri*. III International symposium on tomato diseases. **Acta Hort.** 914, 39–42. 2010.

ARAÚJO, E. R. Competitividade entre espécies de *Xanthomonas* causadoras da mancha bacteriana do tomateiro. Brasília, 2010. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, Brasília.

ARAÚJO, E.R., COSTA, J.R., FERREIRA, M.A.S.V. and QUEZADO-DUVAL, A.M. Simultaneous detection and identification of the *Xanthomonas* species complex associated with tomato bacterial spot using species-specific primers and multiplex PCR. **J. Appl. Microbiol.** 113, 1479–1490. 2012.

ARAÚJO, E. R.; COSTA, J. R.; FERREIRA, M. A. S. V.; QUEZADO-DUVAL, A. M. Widespread distribution of *Xanthomonas perforans* and limited presence of *X. gardneri* in Brazil. **Plant Pathology**, Oxford, v. 66, n. 1, p. 159-168. 2017.

AYYOBI, H.; OLFATI, J. A.; PEYVAST, G. A. The effects of cow manure vermicompost and municipal solid waste compost on peppermint (*Mentha piperita* L.) in torbat-e-jam and rasht regions of Iran. **Int Recycl Org Waste Agric** 3:147–153. 2014. <https://doi.org/10.1007/s40093-014-0077-8>

AZEVEDO, R.A.; ALAS, R.M.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and catalase-deficient mutant of barley. **Physiology Plantarum**, 104, 280-292, 1998.

BALDOTTO, M. A. **Propriedades redox e grupos funcionais de ácidos húmicos**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual do Norte Fluminense “Darcy Ribeiro”, Campos dos Goytacazes. 100p. 2006

BALDOTTO, M. A., CANELLAS, L. P., CANELA, M. C., SIMÕES, M. L., MARTINETO, L., FONTES, M.P.F.; VELLOSO, A. C. X. (2007) Propriedades redox e grupos funcionais de ácidos húmicos isolados de adubos orgânicos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 3:465-475.

BALDOTTO, M. A.; BALDOTTO, L. E. B. Ácidos húmicos. *Revista Ceres* [online]. 2014, v. 61, n. suppl [Acessado 6 Setembro 2021], pp. 856-881. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/0034-737x201461000011>>. Epub 09 Jan 2015. ISSN 2177-3491. <https://doi.org/10.1590/0034-737x201461000011>

BARBOSA, M. R.; SILVA, M. M. A.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; CAMARA, T. R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, p. 453-460, 2014.

BASSANEZI, R.B.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; BERGER, R. D. Gas exchange and emission of chlorophyll fluorescence during the monocycle of rust, angular leaf spot and anthracnose on bean leaves as a function of their trophic characteristics. **Journal of Phytopathology** 150, 37-47. 2002.

BECKERS, G. J. M.; SPOEL, S. H. Fine-tuning plant defence signalling: salicylate versus jasmonate. **Plant Biology**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2006.

BENELLI, G.; CANALE, A.; FLAMINI, G.; CIONI, P.L. Biototoxicity of *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae) essential oil against the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae), and its parasitoid *Psytalia concolor* (Hymenoptera: Braconidae). **Industrial Crop and Products**. 50 (596):603. 2013.

BENETTI, R.; BENETT, K. S. S.; ARRUDA, N.; BENETT, C. G. S.; SELEGUINI, A. Densidade de plantio e substâncias húmicas no cultivo do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.). **Revista de Agricultura Neotropical**, Cassilândia-MS, v. 5, n. 1, p. 75-81, jan./mar. 2018. ISSN 2358-6303.

BENITES, V.M.; MADARI, B.; MACHADO, P.L.O.A. Extração e fracionamento quantitativo de substâncias húmicas do solo: um procedimento simplificado de baixo custo. Comunicado Técnico 16, **EMBRAPA Solos**, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2003. 7pp.

BILGER, W.; SCHREIBER, U.; BOCK, M. Determination of the quantum efficiency of photosystem II and of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. **Oecologia**, Berlin, v. 102, p. 425-432, 1995.

BRESTIC, M.; ZIRVCAK, M. PSII fluorescence techniques for measurement of drought and high temperature stress signal in crop plants: protocols and applications. In: ROU, G. R.; DAS, A. B. **Molecular Stress Physiology of Plants**. Bhubaneswar, India: Springer Dordrecht, p 87- 133, 2013.

BULGARI R, COCETTA G, TRIVELLINI A, VERNIERI P, FERRANTE A. Biostimulants and crop responses: a review. **Biol Agric Hortic**. 31:1–17. 2015. doi: 10.1080/01448765.2014.964649

BURKETOVA, L.; TRD, L.; OTT, P.G.; VALENTOVA, O. Bio-based resistance inducers for sustainable plant protection against pathogens. *Biotechnology Advances*, v.33, n.6, p.994–1004, 2015.

CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O. **Bioquímica**. 5. ed. São Paulo: Thomson, p.845, 2006.

CAMPESTRINI, L. H. ***Aloe barbadensis* Miller: análise do perfil metabólico e estudos dosefeitos vasculogênicos e angiogênicos do extrato do parênquima de reserva, da fração polissacarídica e da acemanana**. 2007. Dissertação (mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC, 2007.

CANELLAS, L.P., ZANDONADI, D.B., BUSATO, J.G., BALDOTTO, M.A., SIMÕES, M.L., MARTIN-NETO, L. Bioactivity and chemical characteristics of humic acids from tropical soils sequence. **Soil Sci**. 173, 624–637. 2008.

CANELLAS, L.P., DANTAS, D.J., AGUIAR, N.O., PERES, L.E.P., ZSÖGÖN, A., OLIVARES, F.L., DOBBSS, L.B., FAC, ANHA, A.R., NEBBIOSO, A., PICCOLO, A. Probing the hormonal activity of fractionated molecular humic components in tomato auxin mutants. **Ann. Appl. Biol**. 159, 202–211. 2011.

CANELLAS, L.P., DOBBSS, L.B., OLIVEIRA, A.L., CHAGAS, J.G., AGUIAR, N.O., RUMJANEK, V.M., NOVOTNY, E.H., OLIVARES, F.L., SPACCINI, R., PICCOLO, A. Chemical properties of humic matter as related to induction of plant lateral roots. *Eur. J. Soil Sci*. 63, 315–324. 2012.

CANELLAS, L.P., MARTÍNEZ-BALMORI, D., MÉDICI, L.O., AGUIAR, N.O., CAMPOSTRINI, E., ROSA, R.C., FAC, ANHA, A., OLIVARES, F.L. A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). **Plant Soil** 366, 119–132. 2013.

CANELLAS, L.P., OLIVARES, F.L. Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. **Chem. Biol. Technol. Agric**. 1, 1–11. 2014.

CANELLAS, L.P., SILVA, S.F., OLK, D., OLIVARES, F.L. Foliar application of *Herbaspirillum seropedicae* and humic acid increase maize yields. *J. Food. Agric. Environ*. 13, 146–153. 2015.

CANELLAS, L.P., CANELLAS, N.O.A., DA S. IRINEU, L.E.S. *et al.* Plant chemical priming by humic acids. **Chem. Biol. Technol. Agric.** 7, 12. 2020. <https://doi.org/10.1186/s40538-020-00178-4>

CASIERRA-POSADA, F.; PEÑA-OLMOS, J. E. Modificaciones fotomorfológicas inducidas por la calidad de la luz en plantas cultivadas. **Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**, v. 39, p. 84-92, 2015.

CHAGAS, R. M. **Alterações fotossintéticas e respostas oxidativas em plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) tratadas com paraquat.** 2007. 82 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2007.

CHEN, Y., AVIAD, T. Effects of humic substances on plant growth. In: American Society of Agronomy, Soil Science Society of America (Eds.), Humic Substances in Soil and Crop Sciences, Selected Readings. **American Society of Agronomy**, Madison, pp. 161–186. 1990.

CHOI, S.; CHUNG, M.H. A review on the relationship between *Aloe vera* components and their biologic effects. **Seminars and Integrative Medicine**, v. 1, p. 53-62, 2003.

CONRATH, U.; PIETERSE, C.M.J.; MAUCH-MANI, B. Priming in plant- pathogen interactions. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 7, p. 210-216, 2002.

COQUEIRO, D. S., & DI PIERO, R. M. Antibiotic activity against *Xanthomonas gardneri* and protection of tomato plants by chitosan. **J Plant Pathol.**, 93, 337-344. 2011. <https://dx.doi.org/10.4454/jpp.v93i2.1188>.

COSTA, J. R. et al. Ocorrência e caracterização do complexo de espécies causadoras da mancha bacteriana do tomateiro no Alto Vale do Rio do Peixe, SC. **Trop. plant pathol.**, Brasília, v. 37, n. 2, p. 149-154, Apr. 2012.

DALIO, R. J. D., et al. Efeitos nas interações planta-patógenos. In: Wilmar Cório da Luz. (Org.). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, RS: Revisão Anual de Patologia de Plantas, ed 1, v. 22, p. 25-68. 2014

DE HITA, D.; FUENTES, M.; FERNÁNDEZ, V.; ZAMARREÑO, A. M.; OLAETXEA, M.; GARCÍA-MINA, J.M. Discriminating the Short-Term Action of Root and Foliar Application of Humic Acids on Plant Growth: Emerging Role of Jasmonic Acid. **Front. Plant Sci.** 11:493. 2020. doi: 10.3389/fpls.2020.00493

DIANEZ, F., SANTOS, M., TELLO, J.C. Suppressive effects of grape marc compost on phytopathogenic oomycetes. **Arch Phytopathol Plant Protect** 40:1–18. 2007. <https://doi.org/10.1080/03235400500222339>

DIEHL, B.; TEICHMULLER, E. E. *Aloe vera*, quality inspection and identification. **Agro Food Industry Hi-Tech**. v. 9. n. 1, p. 14-16. 1998.

DINAKAR, C.; DJILIANOV, D.; BARTELS, D. Photosynthesis in desiccation tolerant plants: energy metabolism and antioxidative stress defense. **Plant Science**, v. 182, p. 29-41, 2012.

DOIDGE, E. M. A tomato canker. **Annals of Applied Biology**, 7: 407-430. 1921. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1921.tb05528.x>

DUTTA, B., LANGSTON, D.B., LUO, X., CARLSON, S., KICHLER, J.; GITAITIS, R. A risk assessment model for bacterial leaf spot of pepper (*Capsicum annuum*), caused by *Xanthomonas euvesicatoria*, based on concentrations of macronutrients, micronutrients, and micronutrient ratios. **Phytopathology**, 107, 1331–1338. 2017.

DYE, D. W. Cultural and biochemical reaction of additional *Xanthomonas* species. *New Zealand Journal of Science* 9, 913– 919. 1966.

DIEHL, B.; TEICHMULLER, E. E. *Aloe vera*, quality inspection and identification. **Agro Food Industry Hi-Tech**. v. 9. n. 1, p. 14-16. 1998.

DU JARDIN P. Plant biostimulants: definition, concept, main categories and regulation. **Sci. Hortic**. 196, 3–14. 10.1016/j.scienta.2015.09.021. 2015.

EMBRAPA/SEBRAE. Catálogo Brasileiro De Hortaliças: saiba como plantar e aproveitar 50 das espécies mais comercializadas no País. Brasília: EMBRAPA. 2010. 59p. Disponível em: <http://www.sebrae.com.br/setor/horticultura>. Acesso em: 27 set. 2021.

FAÇANHA AR; FAÇANHA ALO; OLIVARES FL; GURIDI F; SANTOS GA; VELLOSO A C X ; R U M J A N E K V M ; B R A S I L F; SCHRIPEMA J; BRAZ-FILHO R; OLIVEIRA MA; CANELLAS LP. Bioatividade de ácidos húmicos: efeito sobre o desenvolvimento radicular e sobre a bomba de prótons da membrana plasmática. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 37: 1301-1310. 2002.

FAGAN, E. B.; DOURADO NETO, D.; VIVIAN, R.; FRANCO, R. B.; YEDA, M. P.; MASSIGNAM, L. F.; MARTINS, K. V. Efeito da aplicação de piraclostrobina na taxa fotossintética, respiração, atividade da enzima nitrato redutase e produtividade de grãos de soja. **Bragantia**, v. 69, n. 4, 2010.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Production Yearbook. Rome, Italy www.fao.org/faostat/en/#data/QC. Acessado em: 21 set. 2021.

FEMENIA, A.; SÁNCHEZ, E. S.; SIMAL, S.; ROSSELLÓ, C. Compositional features of polysaccharides from *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) plant tissues. **Carbohydrate Polymers**, v. 39, p. 109-117, 1999.

FILGUEIRA, F. A. R. Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 2. ed. UFV: Viçosa - Minas Gerais, 2005. 412 p.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiologia plantarum**, v. 119, n. 3, p. 355-364, 2003.

FRACCHIA, L.; DOHRMANN, A. B.; MARTINOTTI, M. G.; TEBBE, C. C. Bacterial diversity in a finished compost and vermicompost: differences revealed by cultivation-independent analyses of PCR-amplified 16S rRNA genes. **Appl Microbiol Biotechnol** 71:942–952. 2006. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0228-y>

FRANZENER, G.; BALBI-PEÑA, M.I.; ASSI, L.; STANGARLIN, J.R.; PORTZ, R.L. Control of tomato black spot by turmeric extract: a case study on sustainability. **Scientia Agraria Paranaensis**, v.8, n.1-2, p.99-112, 2009.

FRITSCHÉ-NETO R, BORÉM A. **Melhoramento de plantas para condições de estresses bióticos**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 240p. 2012.

FROST, C. J., MESCHER, M. C., CARLSON, J. E., DE MORAES, C. M. (2008). Plant defense priming against herbivores: getting ready for a different battle. **Plant Physiol.** 146, 818–824. doi: 10.1104/pp.107.113027

GARCIA BRUGGER, A., LAMOTTE, O., VANDELLE, E., BOURQUE, S., LECOURIEUX, D., POINSSOT, B., WENDEHENNE, D., PUGIN, A. **Early signaling events induced by elicitors of plant defenses** Mol. Plant–Microbe Interact, 19, pp. 711-724. 2006.

GARCÍA, A.C., SANTOS, L.A., IZQUIERDO, F.G., RUMJANEK, V.M., CASTRO, R.N., SANTOS, F.S., SOUZA, L.G.A., BERBARA, R.L.L. Potentialities of vermicompost humic acidsto alleviate water stress in rice plants (*Oryza sativa* L.). **J. Geochem. Explor.** 136,48–54. 2014.

GARRITY, G.; HOLT, J. The Road Map to the Manual. 2001. Doi: 10.1007/978-0-387-21609-6_15.

GENTY, B.; BRIANTAIS, J.M.; BAKER, N. **Biochimica Biophysica Acta.** 990: 87. 1989.

GICHABA, V. M.; MURAYA, M.; NDUKHU, H. O. Effects of goat manure-based vermicompost on growth and yield of garlic (*Allium sativum* L.). **Inter J Horticult Agricult Food Sci** 4. 2020. <https://doi.org/10.22161/ijhaf.4.3.1>

GIOVANARDI, D.; DALLAI, D.; DONDINI, L.; MANTOVANI, V. Elicitation of resistance to bacterial canker of stone fruits by humic and fulvic acids (glucohumates): a cDNA-AFLP-dHPLC approach. **Scientia Horticulturae.** 212. 183–192. 10.1016/j.scienta.2016.09.048. 2016.

GRATÃO, P.L., POLLE, A., LEA, P.J., AZEVEDO, R.A. Making the life of heavymetal-stressed plants a little easier. **Funct. Plant Biol.** 32, 481–494. 2005.

GUIMARÃES. T.G.; FONTES, P.C.R.; PEREIRA, P.R.G.; ALVAREZ V., V.H.; MONNERAT, P.H. Chlorophyll content determined by a portable meter and its relationship with nitrogen forms in tomato leaves grown in two types of soil. **Bragantia**, Piracicaba, v. 58, n. 1, p. 209-216, 1999.

HABEEB, F.; SHAKIR, E.; BRADBURY, F.; CAMERON, P.; TARAVATI, M. R.; DRUMMOND, A. J.; GRAY, A. I. FERRO, V. A. Screening methods used to determine the anti-microbial properties of *Aloe vera* inner gel. **Methods**, v.42, p.315–320, 2007.

HAMMERSCHMIDT R. Systemic acquired resistance. p. 173-222. In: Van Loon, L.C., ed. *Advances in botanical research*. Academic Press, New York, NY, USA JONES JDG, DANGL JL: The plant immune system. **Nature** 2006, 444:323-329. 2009.

HARVEY, M.; QUILLEY, S.; BEYNON, H. Exploring the tomato: transformations of nature, society, and economy. Cheltenham, Edward Elgar, 2002. 324p.

HEATH, L. R.,PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts I. Kinetics and stoichiometry of fatty acidperoxidation. **Archives os Biochemistry and Biophysics**, 125:189 – 198. 1968.

HERNANDEZ, O.L., GARCIA, A.C., HUELVA, R., MARTÍNEZ-BALMORI, D., GURIDI, F., AGUIAR,N.O., OLIVARES, F.L., CANELLAS, L.P. Humic substances from vermicompostenhance urban lettuce production. **Agron. Sustain. Dev.** 35, 225–232. 2014.

HU, Y.; XU, J.; HU, Q. Evaluation of antioxidant potential of aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) extracts. **J Agric Food Chem.** 2003 Dec 17;51(26):7788-91. doi: 10.1021/jf034255i. PMID: 14664546.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. LSPA - Levantamento sistemático da produção agrícola: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. AGROPECUÁRIA, D. D. P. C. D. Rio de Janeiro, p.25-130, 2018.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores IBGE - Levantamento Sistemático da Produção Agrícola Estatística da Produção Agrícola. Rio de Janeiro, Fevereiro 2021.

ITAKO, A. T. Effect of chemical products on a bacterial spot (*Xanthomonas perforans*) and on the activation of pathogenesis-related proteins in tomato. **Idesia**, Arica, v. 30, n. 2, p. 85-92, agosto 2012 . Available <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S718-34292012000200011&lng=es&nrm=iso>. Accessed 28 sept. 2021. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292012000200011>

JASSO DE RODRÍGUEZ, D. et al. Antifungal activity in vitroof *Aloe vera* pulp and liquid fraction against plant pathogenic fungi. **Industrial Crops and Products**, v.21, p.81–87, 2005.

JINDO, K., OLIVARES, F. L., MALCHER, D., SÁNCHEZ-MONEDERO, M. A., KEMPENAAR, C., & CANELLAS, L. P. From Lab to Field: Role of Humic Substances Under Open-Field and Greenhouse Conditions as Biostimulant and Biocontrol Agent. **Frontiers in plant science**, 11, 426. 2020.

JONES, J.D.; DANGL, J.L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, p. 323-329, 2006. <http://dx.doi.org/10.1038/nature05286>

JONES, J.; LACY, G.; BOUZAR, H.; STALL, R.; SCHAAD, N. Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. **Systematic and**

Applied Microbiology, v. 27, p.755-762, 2004. Disponível em: <http://naldc.nal.usda.gov/download/1006/PDF>. Acesso em: 28 set 2021.

KANG MC, KIM SY, KIM YT, KIM EA, LEE SH, KO SC, WIJESINGHE WA, SAMARAKOON KW, KIM YS, CHO JH, JANG HS, JEON YJ. In vitro and in vivo antioxidant activities of polysaccharide purified from *Aloe vera* (*Aloe barbadensis*) gel. **Carbohydr Polym**. 2014 Jan; 99:365-71. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.07.091.

KHATTIYAPHUTTHIMET, N.; CHUASAVATHI, T.; IWAI, C. B. Nutrient dynamic of vermicompost tea after adding molasses and oxygen. **Inter J Environ Rural Dev** 10:6–9. 2020.

KIM, Y. H.; KWAK, S. S. The role of antioxidant enzymes during leaf development. In: GUPTA, S. D. (Ed.) Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. Enfield: **Science Publishers**, p.178-203. 2010.

KMET'OVÁ, M.; KOVÁČIK, P. The impact of vermicompost application on the yield parameters of maize (*Zea mays* L.) observed in selected phenological growth stages (BBCH-scale). **Acta Fytotech Zotech** 17:100–108. 2014. <https://doi.org/10.15414/afz.2014.17.04.100-108>

KONE' S.B., DIONNE, A.; TWEDDELL, R.J., ANTOUN, H.; AVIS, T.J. Suppressive effect of non-aerated compost teas on foliar fungal pathogens of tomato. **Biol Control** 52:167–173. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.10.018>

KRAUS, T.E. et al. Paclobutrazol-induced tolerance of wheat leaves to paraquat may involve increased antioxidant enzyme activity. **Journal of Plant Physiology**, 145, 570-576, 1995.

KRAUSE, G.; WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 42, n. 1, p. 313-349, 1991.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A. Doenças do tomateiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L., REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Eds.). Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas. 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 2, 2005, 607-626 p.

LEE, J. K.; LEE, M. K.; YUN, Y. P.; KIM, Y.; KIM, J. S.; KIM, Y. S.; KIM, K.; HUAN, S.S.; LEE, C. K. Acemannan purified from *Aloe vera* induces phenotypic and functional maturation of immature dendritic cells. **International Immunopharmacology**, v. 1, p. 1275-1284, 2001.

LEHMANN, S.; SERRANO, M.; L'HARIDON, F.; TJAMOS, S. E.; METRAUX, J. P. Reactive oxygen species and plant resistance to fungal pathogens. **Phytochemistry**, v. 112, p. 54-62, 2015.

LIMA, A. A.; AVARENGA, M. A. R.; RODRIGUES, L.; CARVALHO, J. G. Leaf nutrient concentration and yield of tomato grown under different substrates and doses of humic acids. **Horticultura Brasileira**, Brasília DF, v. 29, n. 1, p. 63-69, 2011.

LICHTENTHALER, H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigment photosynthetic biomembranes. **Methods Enzymol.**, San Diego, v.148, p. 362-385. 1987.

LOZANO, C. et al. Evaluación del efecto de hidrolatos de ajo (*Allium sativum*) y cebolla junca (*Allium fistulosum*) en el desarrollo de los hongos fitopatógenos *Botrytis alli* y *Sclerotium cepivorum*. **Fitopatología Colombiana**, v.24, n.1, p.29-32, 2000.

LUIZ, C., FELIPINI, R.B., COSTA, M.E.B., DI PIERO, R.M. Polysaccharides from *Aloe barbadensis* reduce the severity of bacterial spot and activate disease-related proteins in tomato. **Journal of Plant Pathology** 94: 387-393. 2012.

LUIZ, C.; SCHAUFFLER, G.P.; LEMOS-BLAINSKI, J. M.; ROSA, D. J.; DI PIERO, R. M. Mechanisms of action of aloe polysaccharides and xanthan gum for control of black rot in cauliflower. **Sci Hort** 200:170–177. 2016.

LUIZ, C.; NETO, A. C. R.; FRANCO, P. O.; DI PIERO, R. M. Emulsions of essential oils and aloe polysaccharides: Antimicrobial activity and resistance inducer potential against *Xanthomonas fragariae*. **Trop. plant pathology**. 2017.

MACHADO, W.; FRANCHINI, J. C.; GUIMARÃES, M. F.; FILHO, J. T. Spectroscopic characterization of humic and fulvic acids in soil aggregates, Brazil. **Helyon** 6. e04078. 2020.

MADEJON, E., LOPEZ, R., MURILLO, J.M., CABRER, A.F. Agricultural use of three (sugar-beet) vinasse composts: effect on crops and chemical properties of a Cambisol soil in the Guadalquivir river valley (SW Spain). **Agric. Ecosyst. Environ.** 84, 55–65. 2001.

MARKWELL, J.; OSTERMAN, J.C.; MITCHELL, J.L. Calibration of the Minolta SPAD-502 leaf chlorophyll meter. **Photosynthesis Research**, v. 46, p. 467-472, 1995.

MCMANUS, P.; STOCKWELL, V. **Antibiotics for plant diseases control: silver bullets or rusty sabers.** APSnet Features Online. 2000. Disponível em: <http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/AntibioticsForPlants.aspx> Acesso em: jun.2021.

MOLDES, C.A.; MEDICI, L.O.; ABRAHÃO, O.S.; TSAI, S.M.; AZEVEDO, R.A. Biochemical responses of glyphosate resistant and susceptible soybean plants exposed to glyphosate. **Acta Physiol Plant**, 30, 469-479, 2008.

MORINIÈRE, L., BURLET, A., ROSENTHAL, E.R., NESME, X., PORTIER, P., BULL, C.T. (2020) Clarifying the taxonomy of the causal agent of bacterial leaf spot of lettuce through a polyphasic approach reveals that *Xanthomonas cynarae* Trébaol et al. 2000 emend. Timilsina et al. 2019 is a later heterotypic synonym of *Xanthomonas hortorum* Vauterin et al. 1995. **Systematic and Applied Microbiology**, 43, 126087.

MOSS, W.P.; BYRNE, J.M.; CAMPBELL, H.L.; JI, P.; BONAS, U.; JONES, J.B.; WILSON, M. Biological control of bacterial spot of tomato using hrp mutants of *Xanthomonas*

campestris pv. *vesicatoria*. **Biological Control**, v.41, n.2, p.199–206, 2007. <http://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.01.008>

MUR, L. A. J.; SIMPSON, C.; KUMARI, A.; GUPTA, A. K.; GUPTA, K. J. 2016. Moving nitrogen to the centre of plant defence against pathogens. Review: part of a special issue on plant immunity. **Annals of Botany** 119: 703–709, 2016 doi:10.1093/aob/mcw179.

NASCIMENTO, A.R.; FERNANDES, P.M.; BORGES, L.C.; MOITA, A.W.; QUEZADO-DUVAL, A.M. Controle químico da mancha bacteriana do tomate para processamento industrial em campo. **Horticultura Brasileira**, v.31, p.15-24, 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362013000100003>

NAIKA, S; JEUDE, J. V. L.; GOFFAU, M.; HILMI, M; DAM, B.V. A cultura do tomate: produção, processamento e comercialização. Fundação Agromisa e CTA, Wageningen, 2006.

NEBBIOSO, A., PICCOLO, A. Basis of a humeomics science: chemical fractionation and molecular characterization of humic biosuprastructures. **Biomacromolecules** 12, 1187–1199. 2011.

NEBBIOSO, A., PICCOLO, A. Advances in humeomic: enhanced structural identification of humic molecules after size fractionation of a soil humic acid. **Anal. Chim. Acta** 720, 77–90. 2012.

NEBBIOSO, A., VINCI, G., DROSOS, M., SPACCINI, R., PICCOLO, A. Unveiling the molecular composition of the unextractable soil organic fraction (humin) by humeomics. **Biol. Fertil. Soils**, 2015.

NI, Y.; TURNER, D.; YATES, K. M.; TIZARD, I. Isolation and characterization of structural components of *Aloe vera* L. leaf pulp. **International Immunopharmacology**, v. 4, p. 1745-1755, 2004.

ORDÓÑEZ-SANTOS, L. E. VÁZQUEZ-ODÉRIZ, L.; ARBONES-MACIÑEIRA, E.; ROMERO-RODRÍGUEZ, M. A. The influence of storage time on micronutrients in bottled tomato pulp. **Food Chemistry**, v.112, p.146–149, 2009.

OSDAGHI, E.; JONES, J. B.; SHARMA, A.; GOSS, E. M.; ABRAHAMIAN, P.; NEWBERRY, E. A.; POTNIS, N.; CARVALHO, R.; CHOUDHARY, M.; PARET, M. L.; TIMILSINA, S.; VALLAD, G. E. 2021. A centenary for bacterial spot of tomato and pepper. **Molecular Plant Pathology**. <https://doi.org/10.1111/mpp.13125>

PAGEAU, K.; REISDORF-CREN, M.; MOROT-GAUDRY, J.F.; MASCLAUX-DAUBRESSE, C. 2006. The two senescence-related markers, GS1 (cytosolic glutamine synthetase) and GDH (glutamate dehydrogenase), involved in nitrogen mobilization, are differentially regulated during pathogen attack and by stress hormones and reactive oxygen species in *Nicotiana tabacum* L. leaves. **Journal of Experimental Botany** 57: 547–557.

PANDEY, R.; MISHRA, A. Antibacterial activities of crude extract of *Aloe barbadensis* to clinically isolated bacterial pathogens. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.60, p.1356-1361, 2010.

PASCHOLATI, S. F.; TOFFANO, L. Indução de Resistência contra Fitopatógenos em Espécies Arbóreas. In: **Indução de Resistência em Plantas a Patógenos**. Cap. 3. Viçosa: UFV, p. 59-66, 2007.

PICCOLO, A., The supramolecular structure of humic substances. A novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. **Adv.Agron.** 75, 57–134. 2002.

PICCOLO, A. The nature of soil organic matter and innovative soil management to fight global changes and maintain agricultural productivity. In: Piccolo, A.(Ed.), Carbon Sequestration in Agricultural Soils: a Multidisciplinary Approach to Innovative Methods. **Springer, Heidelberg**, pp. 1–20. 2012

PICCOLO, A., CONTE, P., COZZOLINO, A. Effects of mineral and monocarboxylic acids on the molecular association of dissolved humic substances. **Eur. J. SoilSci.** 50, 687–694. 1999.

PICCOLO, A., CONTE, P., SPACCINI, R., CHIARELLA, M. Effects of some dicarboxylic acids on the association of dissolved humic substances. **Biol. Fertil. Soils** 37,255–259. 2003.

PICCOLO, A., NARDI, S., CONCHERI, G. Structural characteristics of humic substances as related to nitrate uptake and growth regulation in plant systems. **Soil Biol. Biochem.** 24, 373–380. 1992.

PIMENTEL, A. J. C.; MAGALHÃES, E. C. P. MAGALHÃES, P. M. **Defesa e nutrição de plantas com hidrolato e biomassa resultante da destilação de óleos essenciais**. 10º Simpósio Brasileiro de óleos essenciais (Resumo). Brasília, DF. 2019.

PINTON, R., CESCO, S., IACOLETTIG, G., ASTOLFI, S., VARANINI, Z. Modulation of NO₃-uptake by water-extractable humic substances: involvement of root plasma membrane H⁺-ATPase. **Plant Soil** 215, 155–161. 1999.

PIZZEGHELLO, D., NICOLINI, G., NARDI, S. Hormone-like activity of humic substances in *Fagus sylvatica* forests. **New Phytol.** 151, 647–657. 2001.

POPOV, E. G.; TALANOV, A. V.; KURETS, V. K.; DROZDOV, S. N. Effect of temperature on diurnal changes in CO₂ Exchange in intact cucumber plants. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 50, n. 2, p. 178-182, 2003.

POTNIS, N., TIMILSINA, S., STRAYER, A., SHANTHARAJ, D., BARAK, J.D., PARET, M.L. et al. (2015) Bacterial spot of tomato and pepper. **Molecular Plant Pathology**, 16, 907–920.

PUGLISI, E., FRAGOULIS, G., DEL RE, A.A., SPACCINI, R., PICCOLO, A., GIGLIOTTI, G., SAID-PULLICINO, D., TREVISAN, M. 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** 73,1292–1299. 2008.

QUEZADO-DUVAL, A. M. **Diversidade de *Xanthomonas* spp. associadas à mancha-bacteriana em tomateiro para processamento industrial no Brasil**. Piracicaba, 2003. 111 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

QUEZADO-DUVAL, A. M.; LOPES, C. A.; LEITE JÚNIOR, R. P.; LIMA, M. F.; CAMARGO, L. E. A. Diversity of *Xanthomonas* spp. associated with bacterial spot of processing tomatos in Brazil. **Acta Horticulturae**, v. 695, p. 101-108, 2005.

QUEZADO-DUVAL, A. M.; LOPES, C. A. Mancha bacteriana: uma atualização para o Sistema de Produção Integrada de Tomate Indústria. Circular técnica. Brasília, DF, 2010.

QUEZADO-DUVAL, Alice M et al . Desempenho de híbridos de tomate para processamento industrial em pressão de begomovirose e de mancha-bacteriana. **Hortic. Bras.**, Vitoria da Conquista, v. 32, n. 4, p. 446-452, Dec. 2014.

QUEZADO-SOARES, A. M.; SILVA, V. L.; GIORDANO, L. de B.; LOPES, C. A. Redução na produtividade de tomateiro para processamento industrial devida à mancha bacteriana. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 16, n. 1, 1998. Resumo 266

REIS, L. S.; AZEVEDO, C. A. V.; ALBUQUERQUE, A. W.; JOSUÉ JUNIOR, F. S. Índice de área foliar e produtividade do tomate sob condições de ambiente protegido. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, n.4, p. 386-391, 2013.

REKHA, G.S.; KALEENA, P.K.; ELUMALAI, D.; SRIKUMARAN, M. P.; MAHESWARI, V. N. (2018) Effects of vermicompost and plant growth enhancers on the exo-morphological features of *Capsicum annum* (Linn.) Hepper. **Inter Recycl Org Waste Agricul** 7:83–88. <https://doi.org/10.1007/s40093-017-0191-5>

REYNOLDS, T.; DWECK, A. C. *Aloe vera* leaf gel: a review update. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 68, p. 3-37, 1999.

RIBAS, L.M.; BALDOTTO, M. A.; CANELLAS, L. P.; REZENDE, C.E. Qualidade e mobilidade da matéria orgânica de sistemas adjacentes à Lagoa de Cima, Campos dos Goytacazes–RJ. **Geochimica Brasiliensis**, 22:103- 112. 2008.

RIGANO, L.A., SICILIANO, F., ENRIQUE, R., SENDÍN, L., FILIPPONE, P., TORRES, P.S. *et al.* Biofilm formation, epiphytic fitness, and c anker development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Molecular Plant–Microbe Interactions**, 20, 1222–1230. 2007.

RODRIGUES, L. E. ABCSEM - Associação Brasileira do Comércio de Sementes e Mudanças. Tomaticultura: valioso segmento do agronegócio nacional, 2012. Disponível em: < <http://www.abcsem.com.br/noticia.php?cod=2420> >. Acesso em: 28/09/2021.

ROMEIRO, R. S. **Indução de resistência em plantas a patógenos** In: PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J. R. Cia P (Orgs). Interação planta/patógeno: fisiologia e biologia molecular. Piracicaba. Fealq. pp. 411/429. 2008.

ROMEIRO, R. D. S.; GARCIA, F. A. O. **Indução de resistência em plantas a patógenos por eliciadores de natureza bacteriana**. In: BETTIOL, W. e MORANDI, M. A. B. (Eds.).

Biocontrole de Doenças de Plantas: uso e perspectivas. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 2009. 85-99 p.

SAKS, Y.; BARKAI-GOLAN, R. *Aloe vera* gel activity against planta pathogenic fungi. **Postharvest Biology Technology**, v. 6, p. 159-165, 1995.

SCANDALIOS J. G.; ACEVEDO A.; RUZSA S. Catalase gene expression in response to chronic high temperature stress in maize. **Plant Science**, v. 156, n. 1, p. 103-110, 2000.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 7, p. 995-1014, 2005.

SCHIAVON, M., PIZZEGHELLO, D., MUSCOLO, A., VACCARO, S., FRANCIOSO, O., NARDI, S. High molecular size humic substances enhance phenylpropanoid metabolism in maize (*Zea mays* L.). **J. Chem. Ecol.** 36, 662–669. 2010.

SCHNITZER, M.; KHAN, S.U. Humic substances in the environment New York, Marcel Dekker. 327p. 1972.

SCHREIBER, U. **Photosynthesis Research**. 9: 261. 1986.

SCHEUERELL, S. (2002) **Compost teas and compost amended container for plant disease control** [Ph.D.]. Oregon State University, Corvallis.

SCHUELTER, A. R.; FINGER, F. L; CASALI, V. W. D.; AMARAL, D. S. S. L; SHIMOYA, A. Evaluation of chlorophyll levels in tomato leaves of the cultivar Santa Clara, the mutant 'firm' and the hybrid F1. **Acta Scientiarum: Biological Sciences**. v. 25, n. 1, p. 183-187, 2003.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Potencial de extratos e óleos essenciais de vegetais como indutores de resistência plantas medicinais. In: Pascholati, S. F. **Reunião brasileira sobre indução de resistência em plantas contra fitopatógenos**, v.1, p.27-28, 2002.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R. Extratos e óleos essenciais de plantas medicinais na indução de resistência. In. CAVALCANTI, L. S. et al. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). **Interação Planta Patógeno: Fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p.227-248.

SERKEDJIEVA, J. Antioxidant effects of plant polyphenols: a case study of a polyphenol-rich extract from *Geranium sanguineum* L. In: GUPTA, S.D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfi eld: Science Publishers, 2011. Chap.13, p.275-293.

SHAH, Z.H.; REHMAN, H.M.; AKHTAR T; ALSAMADANY H; HAMOOH BT; MUJTABA T; DAUR, I.; AL ZAHRANI, Y.; ALZAHRANI, H.A.S.; ALI, S; YANG, S.H.;

CHUNG, G. Humic Substances: Determining Potential Molecular Regulatory Processes in Plants. **Front. Plant Sci.** 9:263. 2018. doi: 10.3389/fpls.2018.00263

SHI, J.; FU, X.Z.; PENG, T.; HUANG, X.S.; FAN, Q.J., LIU, J.H. Spermine pre treatment confers dehydration tolerance of citrus in vitro plants via modulation of antioxidative capacity and stomatal response. **Tree Physiology** 30: 914-922. 2010.

SILVA, R. M.; JABLONSKI, A.; SIEWERDT, L.; SILVEIRA JÚNIOR, P. Root development of ryegrass cultivated in complete nutrient solution, added with humic substances, under greenhouse conditions. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 29:1623-1631. 2008.

SIMONTON, T.E., ROBINSON, D., GILLARD, C., JORDAN, K.; TRUEMAN, C.L. Transmission of *Xanthomonas gardneri* to tomato seedlings during transportation and transplanting. **Crop Protection**, 141, 105472. 2021.

SIMSEK-ERSAHIN, Y. ECE, A. KARNEZ, E. Differential Effects of a Vermicompost Fertilizer on Emergence and Seedling Growth of Tomato Plants. **Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology** 5(11):1360. 2014.

SIMÕES, C. T. **Prospecção de elicitores derivados de patógenos visando o controle da mancha bacteriana do tomateiro**. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual Paulista (UNESP). Botucatu, 2020.

STALL, R.E.; BEAULIEU, C.; EGEL, G.; HODGE, N.C.; LEITE, R.P.; MINSAVAGE, G.V.; BOUZAR, H.; JONES, J.B.; ALVAREZ, A.M.; BENEDICT, A. A. Two genetically diverse groups of strains are included in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **International Journal of Systematic Bacteriology** 44, 47– 53. 1994.

STALL, R. E.; JONES, J. B.; MINSAVAGE, G. V. Durability of resistance in tomato and pepper to xanthomonads causing bacterial spot. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 47, p. 265-284, 2009.

STEINER, U.; SCHÖNBECK, F. Induced disease resistance in monocots. In: HAMERSCHMIDT, R.; KUC, J. (Ed.). Induced resistance to disease in plants: developments in plant pathology. **Dordrecht: Kluwer Academic Publishers**, 1995, p. 86-110.

STICHER, L.B.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J.P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Lawrence, v. 35, p. 235- 270, 1997.

ŠUTIC, D. Bakterioze crvenog patlidzana (Tomato bacteriosis). Posebna Izd. Inst. Zasht. Bilja Beograd (Spec. Edit. Inst. Plant Prot. Beograd) 6, 1– 65. English summary: **Review of Applied Mycology** 36, 734-735. 1957.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed., Artmed 918, p. 2013.

TAVERNIER V, CADIOU S, PAGEAU K. The plant nitrogen mobilization promoted by *Colletotrichum lindemuthianum* in Phaseolus leaves depends on fungus pathogenicity. **Journal of Experimental Botany** 58: 3351–3360. 2007.

THAKUR, M.; SOHAL, B. S. Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: a review. **ISRN biochemistry**, v. 2013, p. 1-10, 2013.

TIMILSINA, S. et al. Reclassification of *Xanthomonas gardneri* (ex Šutič 1957) Jones et al. 2006 as a later heterotypic synonym of *Xanthomonas cynarae* Trébaol et al. 2000 and description of *X. cynarae* pv. *cynarae* and *X. cynarae* pv. *gardneri* based on whole genome analyses. **Int. J. Syst. Evol. Micr.** 69, 343–349. 2019.

TIMILSINA, S., POTNIS, N., NEWBERRY, E.A. et al. *Xanthomonas* diversity, virulence 1297 and plant–pathogen interactions. **Nat Rev Microbiol.** 18, 415–427. 2020. 1298 <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0361-8>.

TÖFOLI, J. G.; DOMINGUES, R. J. Controle da pinta preta do tomateiro com o uso de acibenzolar-s-metil isolado, em mistura com fungicidas e em programas de aplicação. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 4, p. 481-487, 2005.

TREVISAN, S., FRANCIOSO, O., QUAGGIOTTI, S., NARDI, S. Humic substances biological activity at the plant–soil interface: from environmental aspects to molecular factors. **Plant Signal. Behav.** 5 (6), 635–643. 2010 a.

TREVISAN, S., PIZZEGHELLO, D., RUPERTI, B., FRANCIOSO, O., SASSI, A., PALME, K., NARDI, S. Humic substances induce lateral root formation and expression of the early auxin-responsive IAA19 gene and DR5 synthetic element in Arabidopsis. **Plant Biol.** 12, 604–614. 2010b.

TKALEC M, VINKOVIĆ T, BALIČEVIĆ R, PARADIKOVIĆ N. Influence of biostimulants on growth and development of bell pepper (*Capsicum annuum* L.). **Acta Agric Serb.** 29:83–88. 2010.

TURNER, C. C.; WILLIAMSON, D. A.; STROUD, P. A.; TALLEY, D. J. Evaluation and comparison of commercially available *Aloe vera* L. products using size exclusion chromatography with refractive index and multi-angle laser light scattering detection. **International Immunopharmacology**, v. 4, p. 1727-1737, 2004.

VALE, F.X.R.; FERNANDES FILHO, E.I.; LIBERATO, J.R. A software plant disease severity assessment. In: **International Congress of Plant Pathology**, 8., 2003, Christchurch. **Anais**. Christchurch: New Zealand, 2003. p.105 (Resumo).

VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v. 36, p. 453-483, 1998.

VARANINI, Z., PINTON, R. Humic substances and plant nutrition. **Prog. Bot.** 56, 97–117. 1995.

VAUTERIN, L.; SWINGS, J.; KERSTERS, K.; GILLIS, M.; MEW, T.; SCHROTH, M.; ALLERONI, N.; HILDEBRAND, D.; STEAD, D.; CIVEROL, E.; HAYWARD, A.; MARAITE, H. (1990). Towards an Improved Taxonomy of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**. doi: 40. 10.1099/00207713-40-3-312.

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. Protective role of exogenous polyamines. **Plant Sci**. 151:59–66. 2000.

VIEGAS, R. M.S. **Avaliação da resistência varietal e do acibenzolar-s-metil no controle da mancha bacteriana (*Xanthomonas euvesicatoria*) em *Capsicum annum***. Dissertação de mestrado, IF Goiano. Morrinhos, GO, 2016.

VIEIRA E. L.; CASTRO. P.R.C. Ação do Stimulate na germinação de sementes, vigor de plântulas e crescimento radicular de plantas de milho (*Zea mays* L.). Piracicaba: ESALQ/USP, 2001.

WAGNER, G. H., and WOLF, D. C. **Carbon transformations and soil organic matter formation**. In “Principles and Applications of Soil Microbiology” (D. M. Sylvia, J. J. Fuhrmann, P. G. Hartel, and D. A. Zuberer). Prentice-Hall, upper Saddle River, NJ, pp. 259-294. 1998.

WALZ. **Portable chlorophyll fluorometer PAM-2000 and data aquisition software DA-2000**. Effeltrich: Walz Mess-und Regeltechnik, 199p. 1993.

YAGI, A.; KABASH, A.; OKAMURA, N.; HARAGUCHI, H.; MOUSTAFA, S. M.; KHALIFA, T. I. Antioxidant, free radical scavenging and anti-inflammatory effects of aloesin derivatives in *Aloe vera*. **Planta Medicinal**, v.68, p.957-960, 2002.

YAGI, A.; KABASH, A.; MIZUNO, K.; MOUSTAFA, S. M.; KHALIFA, T. I.; TSUJI, H. Radical scavenging glycoprotein inhibiting cyclooxygenase-2 and thromboxane A2 synthase from *Aloe vera* gel. **Planta Medicinal**, v.69, p.269-271, 2003.

YILDIRIM, E. Foliar and soil fertilization of humic acid affect productivity and quality of tomato. **Acta Agriculturae Scandinavica**, v.57, p.182-186, 2007.

YOUSEFI, A. A.; SADEGHI, M. Effect of vermicompost and urea chemical fertilizers on yield and yield components of wheat (*Triticum aestivum*) in the field condition. **Int J Agric Crop Sci** 7:1227–1230. 2014.

ZAREI, M.; ABADI, V.A.; MORIDI, A. Comparison of vermiwash and vermicompost tea properties produced from different organic beds under greenhouse conditions. **Inter J Recy Org Waste Agric** 7:25– 32. 2018. <https://doi.org/10.1007/s40093-017-0186-2>

ZUCCO MA, WALTERS SA, CHONG SK, KLUBEK BP, MASABNI JG Effect of soil type and vermicompost applications on tomato growth. **Int J Recycl Org Waste Agric** 4:135–141. 2015. <https://doi.org/10.1007/s40093-015-0093-3>

**4 CAPÍTULO II: *Aloe vera*, *Melaleuca alternifolia* E VERMICOMPOSTO LÍQUIDO
PROMOVEM CRESCIMENTO E INDUZEM RESISTÊNCIA À MANCHA
BACTERIANA EM TOMATEIROS.**

Faccin, D.¹; Tomazetti, T. C.¹; Di Piero, R. M.¹

¹ Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Rodovia Admar
Gonzaga, 1346, Itacorubi, 88.034-001, Florianópolis, SC, Brasil.

Florianópolis, 2021.

RESUMO

Os objetivos deste estudo foram avaliar o potencial de compostos naturais no controle da mancha bacteriana em tomateiros, os mecanismos de ação envolvidos nas respostas de defesa das plantas e as alterações no metabolismo primário, durante a interação com *Xanthomonas hortorum* pv. *gardneri*. Em casa de vegetação, as plantas foram pulverizadas com polissacarídeos de babosa (PB) a 5mg mL^{-1} , hidrolato de melaleuca (HI) a $50\mu\text{L mL}^{-1}$ e vermicomposto líquido (VL) a 10mg COT mL^{-1} , 3 dias antes da inoculação com o patógeno. A severidade da doença foi avaliada no QUANT, nos tempos 0, 7, 14 e 21 dias após a inoculação (d.a.i.) e as plantas previamente tratadas com BA, HI e VL apresentaram redução na severidade de 85%, 70% e 96% respectivamente, em relação às plantas controle. O potencial antimicrobiano dos compostos foi testado em experimentos *in vitro*, em que o confronto entre o patógeno, o HI ($50\mu\text{L mL}^{-1}$) ou os PB (5mg mL^{-1}), resultaram em uma redução de 57% e 26% respectivamente da formação de biofilme bacteriano. Os conteúdos de malondialdeído (MDA) e peróxido de hidrogênio, obtidos pela reação do ácido tiobarbitúrico em amostras foliares 12 horas após a inoculação (h.a.i.), foram reduzidos quando previamente tratados com qualquer um dos compostos naturais e posteriormente inoculadas. Para as análises das enzimas catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), fenilalanina amônia-liase (FAL) e nitrato redutase (NR), foram coletadas amostras foliares no momento da pulverização dos compostos, 72 horas depois (momento da inoculação), 84, 96, 120 e 168 horas após os tratamentos. O tratamento prévio com qualquer um dos compostos aumentou a atividade de enzimas antioxidantes como a CAT e a APX, com picos até 10 vezes maiores que nas plantas controle. A atividade da FAL foi aumentada em 10 vezes em plantas tratadas com PB, sugerindo que os polissacarídeos da *Aloe vera* possuam moléculas elicitoras que induzam a ativação das respostas de defesa das plantas. A promoção de crescimento após o tratamento com VL e, surpreendentemente, com PB, foi representada pelo aumento da biomassa da parte aérea e altura das plantas, bem como aumento de até 3 vezes na atividade da nitrato redutase. Dessa forma, pode-se concluir que os compostos naturais testados possuem a capacidade de reduzir a severidade da mancha bacteriana em tomateiros previamente tratados, através de uma variedade de mecanismos de ação envolvidos tanto no controle direto do patógeno, na melhora do metabolismo primário e do sistema antioxidante, ou ainda pela indução da resistência das plantas.

Palavras-chave: *Aloe vera*, *Melaleuca alternifolia*, vermicomposto, potencial antimicrobiano, EROs, indução de resistência, promoção de crescimento.

ABSTRACT

The objectives of this study were to evaluate the potential of natural compounds to control bacterial spot in tomato plants, the mechanisms of action involved in plant defense responses and changes in primary metabolism, during interaction with *Xanthomonas hortorum* pv. *gardneri*. In a greenhouse, the plants were sprayed with aloe polysaccharides (AP) at 5mg mL⁻¹, tea tree hydrolate (HI) at 50μL mL⁻¹ and liquid vermicompost (LV) at 10 mg TOC mL⁻¹, 3 days before inoculation with the pathogen. Disease severity was evaluated in QUANT, at times 0, 7, 14 and 21 days after inoculation (dai) and plants previously treated with AP, HI and LV showed a reduction in severity of 85%, 70% and 96% respectively, in relation to the control plants. The antimicrobial potential of the compounds was tested in vitro experiments, which the confrontation between the pathogen, the HI (50μL mL⁻¹) or the AP (5mg mL⁻¹), resulted in a reduction of 57% and 26%, respectively, of the formation of bacterial biofilm. Malondialdehyde (MDA) and hydrogen peroxide contents obtained by the reaction of thiobarbituric acid in leaf samples 12 hours after inoculation (h.a.i), were reduced when previously treated with any of the natural compounds and subsequently inoculated. For the analysis of catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and nitrate reductase (NR) enzymes, leaf samples were collected at the time of spraying the compounds, 72 hours later (time of inoculation), 84, 96, 120 and 168 hours after treatments. Previous treatment with any of the compounds increased the activity of enzymes such as CAT and APX, with peaks up to 10 times higher than in control plants. PAL activity was increased 10-fold in plants treated with AP, suggesting that Aloe vera polysaccharides have elicitor molecules that induce the activation of plant defense responses. Growth promotion after treatment with VL and, surprisingly, with AP, was represented by increase in shoot biomass and plant height, as well as up to a 3-fold increase in nitrate reductase activity. Thus, it can be concluded that the tested natural compounds have the ability to reduce the severity of bacterial spot in previously treated tomato plants, through a variety of action mechanisms involved both in direct control of the pathogen, in the improvement of primary metabolism and antioxidant system, or by inducing plant resistance.

Keywords: *Aloe vera*, *Melaleuca alternifolia*, vermicompost, antimicrobial potential, ROS, resistance induction, growth promotion.

4.1 INTRODUÇÃO

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das hortaliças mais consumidas no mundo, de grande importância econômica e social, e que exige ao longo de sua produção o envolvimento de um elevado número de pessoas, com mão de obra qualificada e alto nível tecnológico. Em regiões com condições climáticas adequadas as doenças são favorecidas e podem afetar negativamente o desenvolvimento e a produtividade das plantas (EMBRAPA/SEBRAE, 2010).

A mancha bacteriana é uma das doenças mais devastadoras em tomateiros cultivados em ambientes quentes e úmidos. Ela pode ser causada por 4 linhagens de 3 espécies de *Xanthomonas* (QUEZADO-DUVAL et al., 2005; COSTA et al., 2012; CONSTANTIN et al., 2016; MORINIÈRE et al., 2020), sendo a mais frequente em ambientes de temperaturas mais amenas e alta umidade do ar, como no sul do Brasil, a *Xanthomonas hortorum* pv. *gardneri* (COSTA et al., 2012; ARAÚJO et al., 2017; MORINIÈRE et al., 2020). Os sintomas ocorrem nas folhas, caules e frutos e iniciam-se como pequenas lesões marrons nas folhas jovens, que evoluem para manchas necróticas e, em casos mais severos, o desfolhamento, sujeitando os frutos à escaldadura e abortamento de flores, comprometendo a quantidade e qualidade da produção (LOPES; QUEZADO-SOARES, 1999). Esta doença é de difícil manejo devido à rápida disseminação em condições favoráveis, à transmissão por sementes contaminadas e à ausência de produtos químicos adequados para o controle (FRITSCHÉ-NETO; BORÉM, 2012). Ainda não existem variedades de tomate que confirmam uma resistência satisfatória a essa doença (QUEZADO-DUVAL; LOPES, 2010).

O desenvolvimento de metodologias e produtos para o manejo integrado de doenças em plantas é uma necessidade da agricultura moderna (TALAMINI; STADNIK, 2004), reduzindo assim as práticas que causam alterações e redução da biodiversidade e sustentabilidade da diversidade genética (DAL SOGLIO, 2004). Além disso, é evidente a necessidade de opções de produtos eficazes no controle de doenças para agricultores familiares, orgânicos e agroecológicos, permitindo que estes preparem as soluções naturais em suas propriedades, com baixo custo e que não agridam a saúde do solo, das plantas, dos animais e a saúde humana.

Nesse sentido, os compostos de origem natural como polissacarídeos de plantas e algas, óleos essenciais e hidrolatos, resíduos da produção de cogumelos, produtos da decomposição da matéria orgânica, tornam-se alternativas no controle de doenças em plantas, envolvendo diferentes modos de ação (LUIZ et al., 2012, 2017; DE BORBA et al., 2021; AGUIAR et al., 2020). Estes podem ser de natureza direta, quando possuem potencial

antimicrobiano que inibem o crescimento ou multiplicação dos patógenos, ou de natureza indireta, quando estes compostos induzem a resistência das plantas. As respostas de defesa das plantas induzidas iniciam após o reconhecimento de moléculas elicitoras, que desencadeiam uma cascata de sinalização pelas proteínas MPK, aumento de Ca^{2+} no citosol, produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e, simultaneamente, a reprogramação massiva dos genes de transcrição (BOLLER; FELIX, 2009) para a síntese dos compostos de defesa da planta (VAN LOON et al., 1998).

A babosa (*Aloe vera*) possui em seu parênquima de reserva (gel) principalmente água e polissacarídeos como a acemanana, além de outros componentes como vitamina A, B, C e E, cálcio, potássio, magnésio e zinco, diversos aminoácidos, enzimas e carboidratos (CARVALHO, 2005; SURJUSHE, 2008). O gel é utilizado como matéria prima na indústria cosmética, alimentícia e farmacêutica por apresentar atividades antineoplásica, antimicrobiana, anti-inflamatória (YAGI et al., 2002), antioxidante (YAGI et al., 2003) e antifúngica (LEE et al., 2001). Poucos são os estudos sobre a aplicação da babosa no controle de doenças em plantas, porém, foi relatado um aumento significativo na atividade de enzimas de defesa e redução da mancha bacteriana em plantas de tomate e morango pulverizadas com os polissacarídeos (LUIZ et al, 2012; 2017).

O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* possui como princípio ativo majoritário o terpinen-4-ol (FRANZNER et al. 2007), e apresenta alto potencial antimicrobiano contra pelo menos duas espécies de *Xanthomonas* (LUIZ et al., 2012; 2017), além de induzir a resistência de morangueiros contra *Botrytis cynarae* (SHAO et al., 2013). O alto custo do óleo essencial, a sua volatilidade e a alta propensão à fitotoxidez na planta, podem inviabilizar seu uso. Assim, uma alternativa é o hidrolato, um subproduto aquoso da extração por arraste a vapor do óleo, que mantém os princípios ativos, sendo que contém de 0,05 a 0,20 g de óleo por litro de hidrolato (FRANZNER et al. 2007). Poucos estudos analisaram o potencial do hidrolato no controle de doenças, mas há relato de inibição no desenvolvimento de *Botrytis alli* e *Sclerotium cepivorum* por hidrolatos de alho e cebola (LOZANO et al., 2000), da inibição do crescimento da bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* e da elicitação de fitoalexinas (FRANZNER et al., 2007).

Os bioestimulantes são compostos que melhoram a eficiência nutricional das plantas, as respostas aos estresses abióticos, a produtividade e qualidade dos cultivos, sem levar em conta o seu conteúdo de nutrientes (DU JARDIN, 2015). As substâncias húmicas, extraídas de vermicompostagem e outras matérias orgânicas, podem atuar também no metabolismo secundário por diversos mecanismos de ação. Elas promovem o equilíbrio hormonal, a

capacidade antioxidante da planta (CHEN e AVIAD, 1990; VARANINI e PINTON, 1995; GRATÃO et al., 2005; SCHIAVON et al., 2010; PIZZEGHELLO et al., 2001; GARCÍA et al., 2014), reduzem a toxicidade de radicais livres (CASTRO; VIEIRA, 2001; SILVA et al., 2008), promovem o antagonismo microbiano (BALDOTTO et al., 2007), induzem a resistência do hospedeiro (SCHIAVON et al., 2010; OLIVARES, et al., 2015) e estimulam fatores abióticos de supressão da doença (SIMSEK-ERSAHIN, 2014; CANELLAS et al., 2008; PUGLISI et al., 2008).

O uso de produtos naturais, como os bioestimulantes, que induzem maior capacidade de absorção de nutrientes, torna-se uma prática que garante a promoção de crescimento e melhora a defesa das plantas. Em um estudo foi relatado um aumento na atividade da enzima nitrato redutase (NR) imediatamente após a aplicação foliar de uma fonte exógena de N, e uma posterior diminuição da NR após a inoculação do patógeno, possivelmente devido à realocação de N para o centro de defesa da planta (OLEA et al., 2004; PAGEAU et al., 2006). A NR é a primeira enzima no processo de assimilação de N nas plantas responsável pela redução do nitrato (PURCINO et al., 1994), e por esse papel regulador, a atividade da NR poderia estar relacionada com a produtividade das culturas, visto que plantas com alta atividade desta enzima teriam maior capacidade de assimilar o nitrato disponível e, em consequência, melhores condições nutricionais (BEEVERS; HAGEMAN, 1969).

Para que as plantas consigam responder a estresses bióticos e abióticos, além de bem nutridas, é preciso que seu sistema de defesa seja eficiente e atue no local certo, no momento exato e na intensidade adequada. Uma das primeiras respostas de defesa é a síntese de espécies reativas de oxigênio (EROs) que, em grandes quantidades podem causar danos à planta como a peroxidação dos lipídios de membranas da célula e de organelas, e consequente extravasamento de conteúdo e morte celular. De acordo com Moller et al. (2007), as plantas dispõem de um sistema antioxidante enzimático composto pela superóxido dismutase (SOD), catalases (CAT), peroxidases (POD), glutathione peroxidase (GPX), ascorbato peroxidase (APX), glutathione reductase (GR) e glutathione S-transferase (GST), e não enzimático (ácido ascórbico e carotenoides), que trabalham em conjunto para desintoxicar as células e reduzir a extensão dos danos oxidativos. O equilíbrio entre a produção das EROS e a ação da CAT e APX é fundamental para a recuperação das células infectadas. As APXs são consideradas as enzimas mais importantes na eliminação de H_2O_2 no citosol, nas mitocôndrias (FOYER; MULLINEAUX, 1994; POLLE, 2001; SHIGEOKA et al., 2002; LEONARDIS et al., 2000) e nos cloroplastos (INZÉ; MONTAGU, 1995), sendo que nestes últimos não existe catalase presente (MITTLER, 2002). A função principal da CAT é prevenir os efeitos potencialmente

danosos causados por alterações na homeostase de H₂O₂ dentro dos peroxissomos (VAN BREUSEGEM et al., 2001; IGAMBERDIEV; LEA, 2002), durante a fotorrespiração e a β-oxidação dos ácidos graxos (DUBEY, 2010), e é efetiva principalmente em concentrações relativamente altas de H₂O₂, o que ocorre em condições de estresse severo como o ataque de patógenos.

A enzima fenilalanina amônia-liase (FAL) é considerada chave na resistência de plantas a patógenos, pois é a primeira enzima na síntese dos fenilpropanoides. O aumento da atividade da FAL está fortemente relacionado aos diferentes tipos de estresses, entre eles à invasão por patógenos, no entanto, também pode ser ativada pela presença de elicitores. Por ação da maior atividade da FAL, ocorre aumento na produção dos compostos fenólicos e fitoalexinas com propriedades antimicrobianas e potencialização nas respostas estruturais, como a síntese e a deposição de lignina nos tecidos, que atuam como barreira física contra o ataque de patógenos (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2016).

Dessa forma, o presente trabalho buscou avaliar as alterações no metabolismo primário e nos mecanismos de ação envolvidos nas respostas de defesa de plantas de tomate contra *Xanthomonas hortorum* pv. *gardneri*, após a aplicação foliar de compostos naturais com potencial antimicrobiano, protetores de danos oxidativos, indutores de resistência e promotores de crescimento.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Material vegetal e isolado bacteriano

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Santa Catarina. A temperatura média durante os experimentos foi de 23°C. Sementes de tomate Santa Cruz Kada foram semeadas em substrato Plantmax® e 15 dias após a semeadura, duas plântulas foram transferidas para vasos de 2L contendo substrato Carolina®. A bactéria *Xanthomonas hortorum* pv. *gardneri*, cedida pela empresa Sakata Seed Sudamerica LTDA, SAKATA®; e identificada molecularmente por BOX-PCR no Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças da Embrapa, Brasília, DF, foi mantida a 25 °C em tampão fosfato de potássio (pH 7,0). A repicagem foi realizada em meio NA e as placas incubadas a 25 °C, durante 48h. A suspensão bacteriana foi ajustada a D.O._{600nm} = 0,6.

4.2.2 Obtenção dos compostos

Os polissacarídeos da babosa (PB) foram extraídos conforme Luiz et al. (2017). Das folhas da babosa (*Aloe vera*) foi retirado o parênquima e triturado até uma mistura homogênea. Foram adicionados 3 volumes de etanol 92% para cada um volume de gel e a mistura mantida a 7 °C durante 24 horas. A mistura foi filtrada e levada à estufa a 40 °C até atingir peso constante. A amostra seca foi macerada em nitrogênio líquido com auxílio de almofariz de porcelana. Para o preparo da suspensão, os polissacarídeos foram solubilizados em água destilada (5 mg mL⁻¹), agitados em ultra-Turrax a 20000 rpm por 15 minutos, aquecidos durante 30 minutos a 80°C e resfriados até 25°C. O pH foi ajustado para 5,6, utilizando NaOH. A suspensão foi incubada a 4 °C por 12 horas antes da aplicação nas plantas. As concentrações dos polissacarídeos utilizados foram de 1, 3 e 5 mg mL⁻¹, dissolvidos em água destilada.

O hidrolato de melaleuca (HI) (Herbia®) foi adquirido em lojas de produtos naturais em Florianópolis, SC. Ele foi obtido como subproduto aquoso da extração por arraste a vapor do óleo essencial de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) e contém 39,04% de terpinen-4-ol. O pH da solução final foi 6,0 e as concentrações usadas foram de 5, 10 e 50 µL mL⁻¹ de HI, dissolvidos em água destilada.

O vermicomposto líquido (VL) foi obtido como produto resultante da decomposição de matéria orgânica caseira (restos de frutas, legumes, cascas de ovos) com a utilização de minhocas californianas. O chorume foi maturado por pelo menos 60 dias antes de ser diluído em água e o pH da solução final foi 6,8. O conteúdo de carbono orgânico total (COT) foi estimado segundo Tedesco et al. (1995), no Laboratório de Solos do Centro de Pesquisa para Agricultura Familiar - Cepaf/Epagri, Chapecó, SC. As concentrações usadas foram de 10, 20 e 40 mg COT mL⁻¹, dissolvidos em água destilada. Foram utilizadas amostras do mesmo chorume em todos os experimentos.

4.2.3 Análise de desenvolvimento

Plantas de tomate com cinco folhas definitivas foram tratadas com os compostos naturais e avaliadas quanto ao crescimento em altura e produção de biomassa. Os tratamentos consistiram na pulverização foliar em toda a parte aérea do tomateiro, de 10 ml por planta de PB a 5 mg mL⁻¹, HI a 50 µL mL⁻¹ e VL a 10 mg COT mL⁻¹ (melhores concentrações obtidas em estudos preliminares). Após os tratamentos, algumas plantas foram inoculadas e outras mantidas como controle.

O crescimento foi estimado pela diferença entre altura final (após 21 dias da inoculação) e altura inicial (logo após transplante para o vaso). Ao final do experimento, as plantas foram separadas em raiz e parte aérea, secas em estufa a 60°C por 48 h e pesadas para

estimar a biomassa. Os experimentos foram realizados duas vezes, cada tratamento com 7 repetições e a unidade experimental foi um vaso contendo duas plantas.

4.2.4 Efeito antimicrobiano *in vitro*

O efeito antimicrobiano de PB, HI e VL contra *X. hortorum* pv. *gardneri* foi avaliado através do teste de formação de biofilme em microplaca, segundo Rigano et al. (2007). As bactérias foram cultivadas em meio NA, a 26°C, e inoculadas em meio líquido Luria Bertani (LB). As suspensões foram agitadas durante a noite até atingirem a densidade óptica 1,0 a 600 nm. Neste momento, em microplaca de 96 poços, foram adicionados 100 µL da suspensão bacteriana a 100 µL dos compostos naturais nas diferentes concentrações: PB a 1, 3 e 5 mg mL⁻¹; HI a 5, 10 e 50 µl mL⁻¹; VL a 10, 20 e 40 mg COT mL⁻¹ (filtrado em membrana milipore 0,45 µm); e incubada a 26°C por 7 dias. As suspensões foram removidas com três lavagens em água destilada e as placas secas em estufa a 60°C por 30 minutos para fixação do biofilme na placa. Foram adicionados então 200 µl do corante violeta cristal a 0,3% (p/v) e deixados em repouso por 45 minutos. Os poços foram lavados três vezes em água destilada, e o biofilme aderido aos poços foram solubilizados com 200 µl de acetona-etanol (20% etanol). A leitura da absorbância foi feita a 570 nm em leitor de microplacas (SpectraMax Paradigm Multi-Mode Microplate Reader). Foram utilizadas 7 repetições para cada tratamento e controle (meio LB) e as medições feitas em triplicatas.

4.2.5 Controle da mancha bacteriana no tomateiro por compostos naturais

Para o estudo do controle da mancha bacteriana no tomateiro foram pulverizados 10 mL dos compostos naturais em toda a parte aérea das plantas, quando estas apresentavam cinco folhas definitivas. Os tratamentos consistiram em água (controle), PB a 5 mg mL⁻¹, HI a 50 µL mL⁻¹ e VL a 10 mg COT mL⁻¹ (melhores concentrações obtidas em estudos preliminares). Após 3 dias, toda a parte aérea das plantas foi inoculada com *X. hortorum* pv. *gardneri* (D.O. 0,6; 600 nm) até o ponto escorrimento (~10 mL por vaso). As plantas permaneceram em câmara úmida por 48 hs. Os experimentos foram montados em blocos inteiramente casualizados, com 7 repetições por tratamento, sendo cada repetição um vaso com duas plantas. Os experimentos foram realizados duas vezes. A severidade da doença foi quantificada pela porcentagem de área foliar lesionada das 3^o e 4^o folhas de plantas sintomáticas. As folhas foram fotografadas e analisadas pelo software QUANT (VALE et al., 2003). As avaliações foram feitas aos 7, 14 e 21 dias após a inoculação (d.a.i.) do patógeno.

4.2.6 Análise de dano celular

Para análise de dano celular foram coletadas amostras foliares de plantas de tomate tratadas com água destilada, PB (5 mg mL⁻¹), HI (50 µL mL⁻¹) e VL (10 mg COT mL⁻¹) e inoculadas ou não com o patógeno 3 dias depois. A coleta de material vegetal fresco (3° e 4° folhas) para a quantificação de peróxido de hidrogênio e da peroxidação lipídica, assim como para a observação de acúmulo de peróxido nos folíolos, foi feita 12 horas após a inoculação. A unidade experimental foi um vaso contendo duas plantas e cada tratamento composto por 4 repetições.

A quantificação de peróxido de hidrogênio foi realizada utilizando 0,1g de material foliar que foi homogeneizada em banho de gelo com 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1%. A mistura foi centrifugada a 12.000 g, por 15 minutos a 4°C, e 0,5mL do sobrenadante foram adicionados ao tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0, contendo 1mL da solução de iodeto de sódio e incubada por 5 minutos. O produto da oxidação foi quantificado a 390nm (VELIKOVA, 2000). A quantidade de peróxido de hidrogênio formada foi determinada comparando os valores de absorvância aos valores conhecidos da curva padrão de peróxido e expressos em nmol H₂O₂. g⁻¹ peso fresco.

Para visualizar o acúmulo de peróxido de hidrogênio, os folíolos coletados foram imediatamente colocados em solução DAB-HCl 1mg mL⁻¹ e deixados reagindo durante a noite. A solução de DAB foi substituída pela solução de clareamento de etanol: ácido acético (3:1, v:v) (SHI et al., 2010). Após 8 horas, os folíolos foram fotografados e observados quanto à presença de pontos marrons escuros nas nervuras principais e secundárias, que são acúmulos de peróxido corados pelo DAB.

O conteúdo de malondialdeído (MDA) revela a quantidade de peroxidação lipídica da membrana e foi determinado pela reação do ácido tiobarbitúrico (TBA), conforme descrito por Heath e Packer (1968). Uma amostra de 0,2 g de material foliar foi macerada em 2mL de ácido tricloroacético (TCA 0,1%) contendo PVPP (20%). Após homogeneização a amostra foi centrifugada a 13000 g por 10 minutos a 4°C. Em 0,250 mL do sobrenadante foi adicionado 1 mL de TCA 20%, contendo TBA 1%, por 30 minutos a 95°C. A reação foi parada por um banho de gelo por 10 minutos e ambientadas no escuro por 15 minutos para atingir temperatura ambiente. A absorvância do produto da reação foi medida a 532 e 600 nm e a quantidade de MDA foi expressa em mmol MDA. g peso fresco⁻¹.

4.2.7 Análises enzimáticas

Plantas de tomate com cinco folhas verdadeiras foram pulverizadas com água destilada (controle), PB a 5 mg mL^{-1} , HI ($50 \text{ } \mu\text{L mL}^{-1}$) e VL ($10 \text{ mg COT mL}^{-1}$), e inoculadas com *X. hortorum* pv. *gardneri* 3 dias depois. Amostras foliares (3^o e 4^o folhas) foram coletadas antes da aplicação dos tratamentos e 0, 12, 24, 48 e 96 horas após a inoculação. Cada tratamento teve 5 repetições biológicas, sendo que cada vaso continha duas plantas.

4.2.7.1 Atividade da ascorbato peroxidase, catalase e fenilalanina amônia-liase

Para o preparo dos extratos proteicos utilizados nas reações destas análises, 700 mg de tecido foliar foram macerados em cadinho/pistilo de porcelana com 4 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,5, contendo EDTA 1 mM e PVPP 1%. As suspensões resultantes foram centrifugadas a 10.000 g a 4°C por 30 minutos. O sobrenadante foi utilizado como extrato proteico.

A atividade da ascorbato peroxidase (APX) foi determinada segundo Moldes et al (2008). A reação ocorreu após a adição de $50 \mu\text{L}$ de extrato proteico em $650 \mu\text{L}$ de tampão fosfato 80 mM, pH 7,0, $100 \mu\text{L}$ de ascorbato 5 mM, $100 \mu\text{L}$ EDTA 1mM e $100 \mu\text{L}$ de H_2O_2 1 mM. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $2,8 \text{ mM cm}^{-1}$. As leituras foram realizadas em leitor de microplacas a 290 nm, durante 1 minuto. Os valores foram expressos em $\mu\text{mol ascorbato min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$.

A atividade da catalase (CAT) foi determinada segundo Kraus et al. (1995), a 240 nm durante 1 minuto, com leituras a cada 4 segundos. A reação foi iniciada pela adição de $25 \mu\text{l}$ de extrato vegetal em 10 ml de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e $25 \mu\text{l}$ H_2O_2 30%. Para calcular a atividade específica da enzima foi utilizado o coeficiente de extinção molar do H_2O_2 ($39,4 \text{ mmol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e os resultados foram expressos em $\mu\text{mol de peróxido de hidrogênio min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$.

A atividade da fenilalanina amônia-liase (FAL) foi determinada segundo Falcón *et al.* (2008). Como substrato, foi utilizada fenilalanina 50 mM em tampão borato de sódio 100 mM (pH 8,8). Em $450 \mu\text{L}$ do substrato foram acrescentados $50 \mu\text{L}$ do extrato proteico e a mistura incubada a 40°C por 1 h. A reação foi interrompida pela adição de $200 \mu\text{L}$ de HCl 5 N e banho de gelo por 5 min. Foram adicionados $300 \mu\text{L}$ de água e a absorbância da solução foi mensurada a 290 nm em leitor de microplaca. Os resultados foram plotados em curva padrão de ácido transcinâmico e expressos como $\text{mmol ácido trans-cinâmico mg proteína}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

4.2.7.2 Atividade da Nitrato Redutase

Para análise da nitrato redutase (NR) foram triturados 1g dos tecidos foliares em cadinho de porcelana com uma solução tampão (1:3; v:v) de Hepes-NaOH 100 mM, pH 7,5, contendo solução de MgCl₂ a 5 mM e solução de ditioneitol a 1 mM (DTT). O extrato foi filtrado e clarificado por centrifugação a 20.000g por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi usado para análise enzimática. A atividade da enzima foi determinada pela adição de 400 µL de extrato proteico ao tampão fosfato de potássio 100 mM, contendo KNO₃ a 100 mM. A atividade foi medida espectrofotometricamente a 540 nm e a curva de calibração feita com concentrações conhecidas de NaNO₂ (LEWIS *et al.*, 1982). Os resultados foram expressos em µg nitrito min⁻¹ g massa fresca⁻¹.

4.2.7.3 Dosagem de proteínas totais

A quantificação de proteínas totais das amostras foliares foi feita pelo método de Bradford (1976). Para a reação foram adicionados 193 µL do reagente a 7 µL do extrato proteico de cada amostra foliar. A solução foi incubada por 15 minutos em temperatura ambiente. Foram feitas leituras das absorbâncias em leitor de microplaca a 595 nm, que foram convertidos em concentração de proteína solúvel, e esta comparada às leituras de soluções padrão de albumina de soro bovino.

4.2.8 Análises estatísticas

Os experimentos foram montados de acordo com o delineamento estatístico completamente casualizado, com sete repetições por tratamento, exceto quando indicado. O teste de Barlett ($\alpha \leq 0,05$) foi utilizado para verificar a homogeneidade das variâncias em todos os experimentos. A análise de variância, teste F (5%) e teste de Tukey ou teste de Welch ($p \leq 0.05$) foram usados quando apropriado. As análises foram realizadas em Python 3 (<https://www.python.org/>), com auxílio das bibliotecas Pandas e Bioinfokit (<https://github.com/reneshbedre/bioinfokit>). Os gráficos resultantes foram gerados em Excel 2013.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Efeito antimicrobiano *in vitro*

O composto natural com maior atividade antimicrobiana contra *X. hortorum* pv. *gardneri* foi o hidrolato de melaleuca (HI) a 50 µL mL⁻¹, reduzindo mais de 57% da formação de biofilme quando comparado ao controle (Figura 1). Os polissacarídeos da babosa (PB) reduziram de 15 a 26% a formação de biofilme. O potencial antimicrobiano do VL se

manifestou apenas na concentração 10 mg COT mL⁻¹, com redução de 16% do biofilme. As demais concentrações promoveram crescimento não só de outras bactérias, como de outros microrganismos como fungos e leveduras, impossibilitando uma adequada quantificação de biofilme bacteriano formado (dados não mostrados).

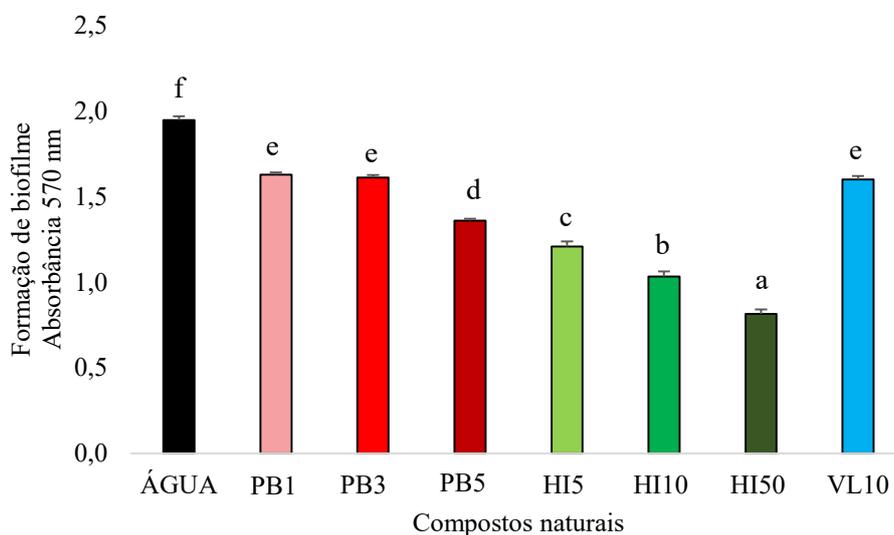


Figura 1. Formação de biofilme bacteriano de *X. hortorum* pv. *gardneri* em confronto com água destilada (controle), polissacarídeos de babosa (PB) a 1, 3 e 5 mg mL⁻¹, hidrolato de melaleuca (HI) a 5, 10 e 50 µL mL⁻¹ e vermicomposto líquido (VL) a 10 mg COT mL⁻¹. Barras representam o erro padrão das médias. Letras diferentes indicam que os valores médios são significativamente diferentes, baseados no teste de Tukey, p < 0,05.

4.3.2 Controle da mancha bacteriana

A pulverização foliar dos três compostos reduziu significativamente a severidade da doença em ambos os experimentos realizados (Figura 2: experimento 1; Figura Suplementar 1: experimento 2). O vermicomposto líquido (VL) promoveu o maior efeito protetor contra a mancha bacteriana, com redução de até 92% na severidade em relação às plantas controle, enquanto que os polissacarídeos da babosa (PB) e o hidrolato de melaleuca (HI) reduziram em 85% e 70%, respectivamente, a área foliar lesionada.

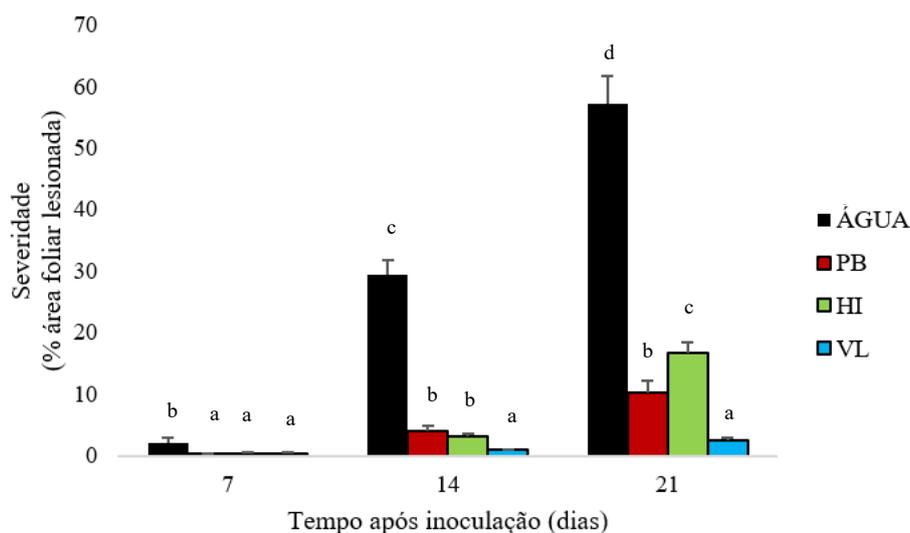


Figura 2. Experimento 1 - Severidade da mancha bacteriana em plantas de tomate tratadas com água destilada, polissacarídeos da babosa (PB) a 5 mg mL^{-1} , hidrolato de melaleuca (HI) a $50 \mu\text{l mL}^{-1}$ e vermicomposto líquido (VL) a $10 \text{ mg COT mL}^{-1}$, inoculadas com *X. hortorum* pv. *gardneri* 3 dias após os tratamentos. A avaliação da doença foi realizada aos 7, 14 e 21 dias após a inoculação. Barras representam o erro padrão das médias. Letras diferentes indicam que os valores médios são significativamente diferentes no mesmo tempo baseados no teste de Tukey, $p < 0,05$.

4.3.3 Análise de desenvolvimento

Em relação ao desenvolvimento das plantas (Figura 3), o tratamento com o vermicomposto líquido (VL) proporcionou maior aumento, tanto para a biomassa (Figura 3A e 3B) quanto para o crescimento em altura (Figura 3C e 3D), com diferenças significativas em relação à aplicação dos demais compostos e ao controle. A inoculação não interferiu na promoção do crescimento em plantas tratadas previamente com VL. Os polissacarídeos da babosa (PB) forneceram aporte de biomassa às plantas tratadas e inoculadas (Figuras 3A e 3B), mas em menor proporção quando comparado ao vermicomposto. Os valores de biomassa de plantas tratadas com o hidrolato não diferiram das plantas controle, e em relação à altura (Figuras 3C e 3D), apenas em plantas inoculadas a altura foi maior que a testemunha.

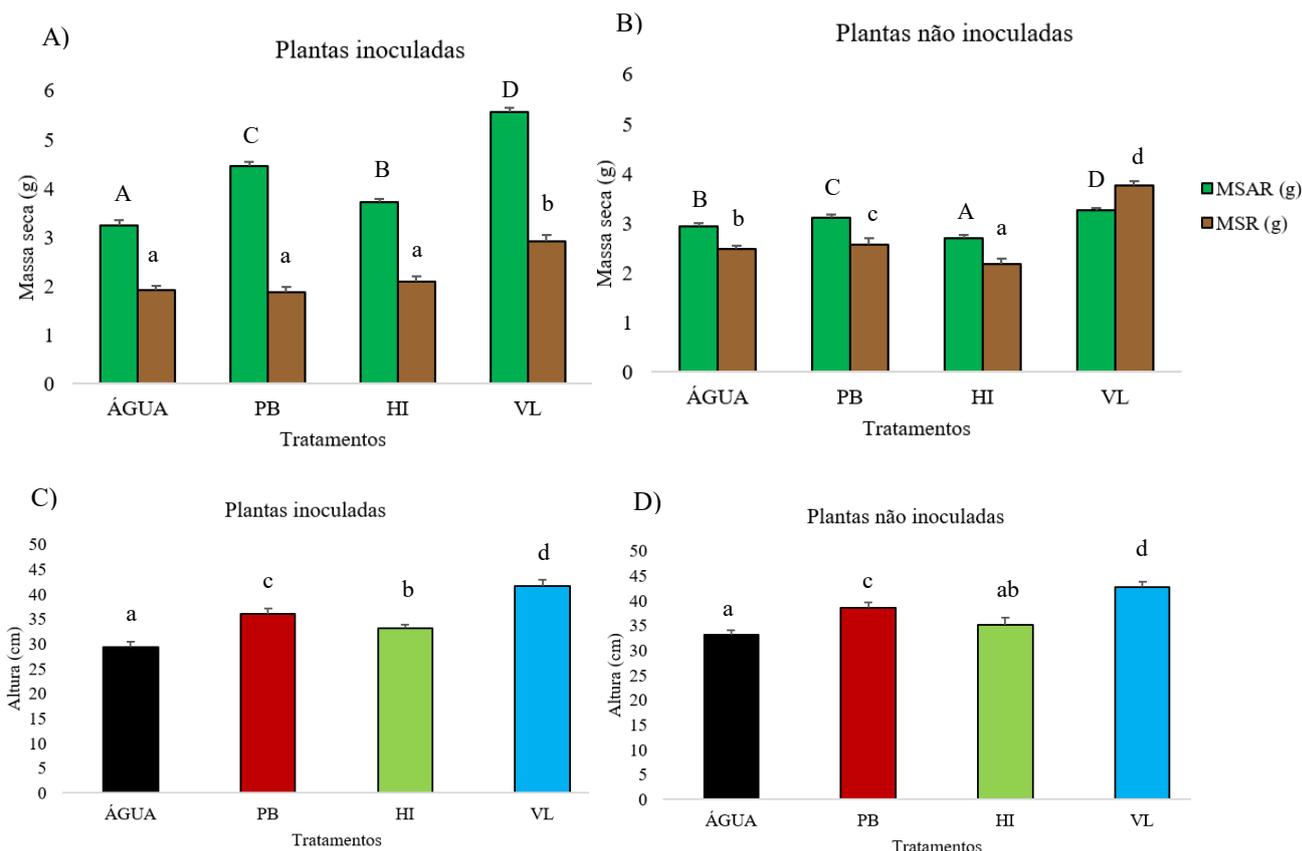


Figura 3. Desenvolvimento de tomateiros inoculados (A e C) e não inoculados (B e D), previamente tratados com água destilada, polissacarídeos de babosa (PB), hidrolato de melaleuca (HI) e vermicomposto líquido (VL). Massa seca de parte aérea (MSAR), massa seca de raízes (MSR) (A e B) e altura de plantas (C e D) avaliados desde o transplante das mudas até 21 d.a.i. Barras representam o erro padrão das médias. Letras diferentes indicam que os valores médios são significativamente diferentes entre os tratamentos, baseados no teste de Tukey, $p < 0,05$.

4.3.4 Análise de dano celular

A peroxidação de lipídios foi significativamente reduzida após a pulverização de qualquer um dos compostos naturais, em plantas que tiveram posterior contato com o patógeno (Figura 4A). Em plantas não inoculadas (Figura 4B) HI e VL aumentaram o conteúdo de MDA extravasado.

O conteúdo de H_2O_2 foi menor em todas as plantas tratadas com os compostos e posteriormente inoculadas (Figura 4C), com destaque para a diminuição de 50% de peróxido em plantas previamente tratadas com PB. Em plantas não inoculadas (Figura 4D), não houve diferença significativa entre os tratamentos e a testemunha, porém, os valores foram significativamente menores que nas plantas inoculadas.

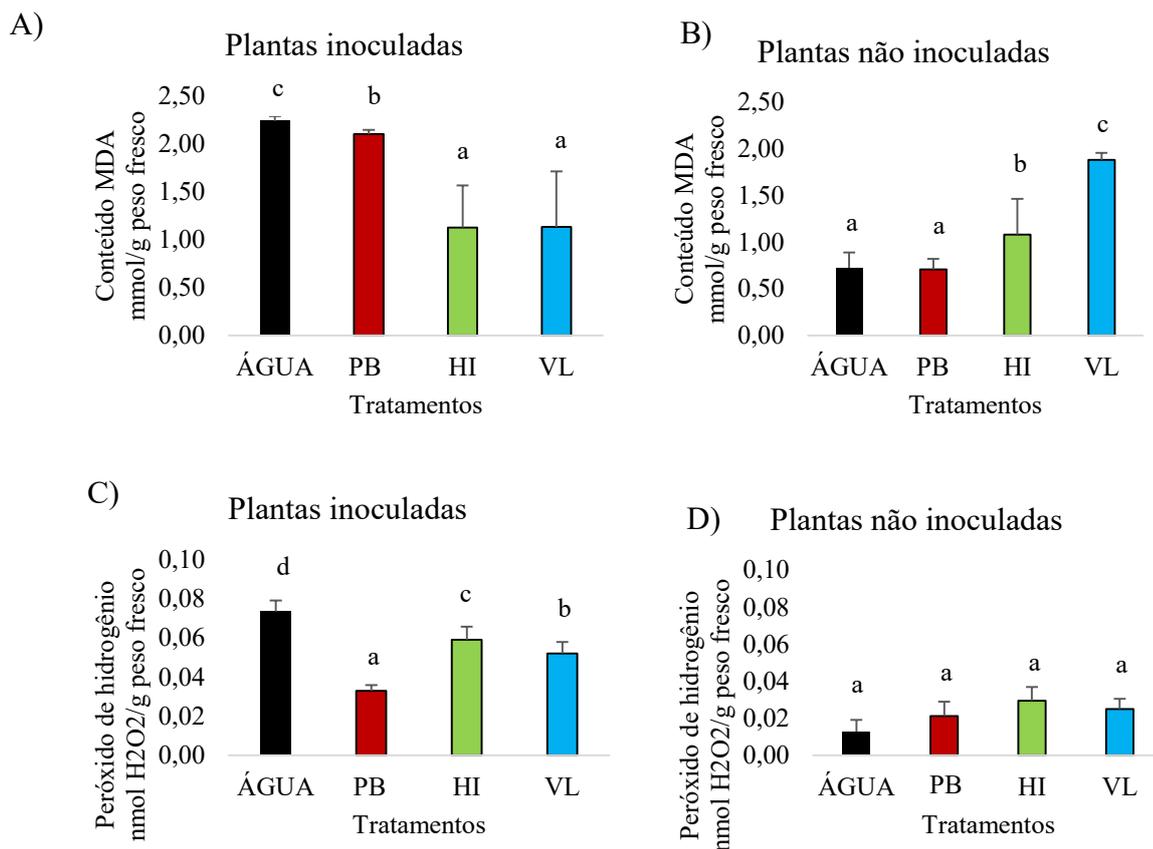


Figura 4. Peroxidação lipídica representada pelo conteúdo de malondialdeído (MDA) em plantas inoculadas (A) e plantas não inoculadas (B) e quantificação de peróxido de hidrogênio em plantas inoculadas (C) e não inoculadas (D). Os tratamentos foram água destilada, polissacarídeos de babosa (PB), hidrolato de melaleuca (HI) ou vermicomposto líquido (VL). Material vegetal coletado 12 horas após inoculação. Barras representam o erro padrão das médias. Letras diferentes indicam que os valores médios são significativamente diferentes, baseados no teste de Tukey, $p < 0,05$.

O acúmulo de H_2O_2 pôde ser visualmente observado nas nervuras principais e secundárias das folhas (pontos marrons) das plantas tratadas com compostos naturais submetidas ou não ao estresse da inoculação (Figura 5). Foi possível notar uma clara diferença de acúmulo de H_2O_2 nas nervuras dos folíolos inoculados e não inoculados. A aplicação foliar de VL e HI estimulou por si só o acúmulo, mesmo sem a presença do patógeno, porém em menor concentração quando comparado às plantas inoculadas.

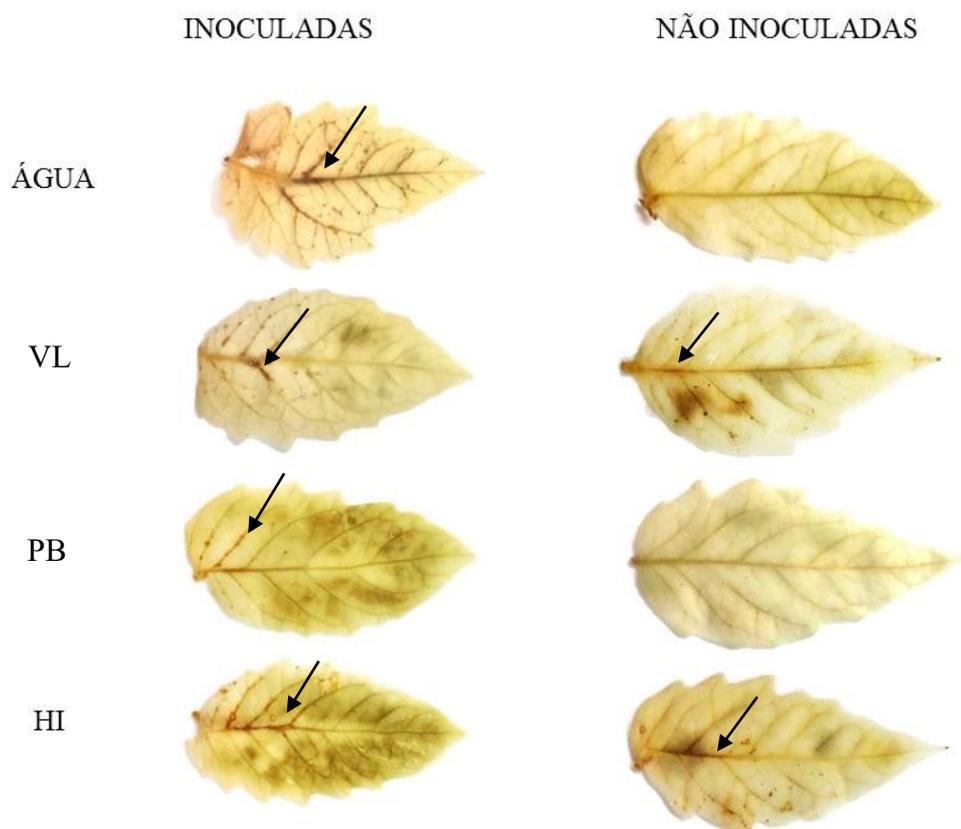


Figura 5. Acúmulo de peróxido de hidrogênio (pontos marrons indicado pelas setas) em folíolos destacados de plantas inoculadas e não inoculadas, previamente tratadas com água (controle), vermicomposto líquido (VL), polissacarídeos de babosa (PB) e hidrolato de melaleuca (HI). Material vegetal coletado 12 horas após a inoculação, depositados em solução DAB-HCl 0,3% *overnight* e solução de clareamento por 8 horas.

4.3.5 Análises enzimáticas

A atividade da catalase (CAT) aumentou significativamente em plantas tratadas com PB, HI e VL, em diferentes tempos após a inoculação (Figura 6A). Plantas previamente tratadas com PB apresentaram um pico de atividade 12 horas após a inoculação (h.a.i.), correspondendo a 84 horas após o tratamento (h.a.t.), com valores 5 vezes maiores que a testemunha inoculada, e um menor pico 48 h.a.i. (120 h.a.t.). Por sua vez, HI e VL promoveram aumento de até 4 vezes na atividade desta enzima, 24 h.a.i. (96 h.a.t.). Em plantas não inoculadas (Figura 6B), os compostos promoveram aumentos menos expressivos na atividade da CAT, e os valores foram até 5 vezes menores em comparação às plantas que foram submetidas à inoculação.

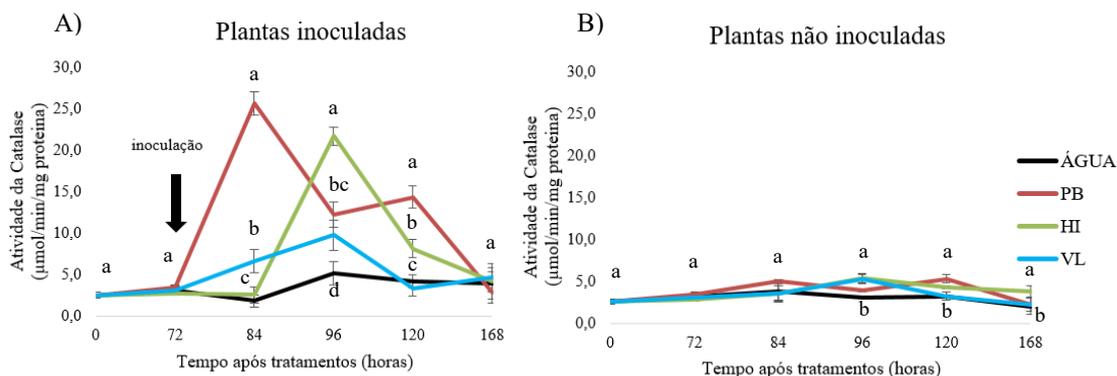


Figura 6. Atividade da catalase em plantas tratadas com água destilada, polissacarídeos de babosa (PB), hidrolato de melaleuca (HI) e vermicomposto líquido (VL), e inoculadas (A) ou não inoculadas (B) 3 dias depois dos tratamentos. Avaliações feitas antes dos tratamentos (0), antes da inoculação (72), e 84, 96, 120 e 168 horas após os tratamentos. Barras representam o erro padrão das médias. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos no mesmo tempo de avaliação, baseado no teste de Tukey ($p < 0,05$). Seta preta indica momento da inoculação com *Xanthomonas hortorum* pv. *gardneri*.

A atividade da ascorbato peroxidase (APX) em plantas inoculadas (Figura 7A) foi significativamente aumentada a partir de 24 h.a.i. (96 h.a.t.), e nas plantas tratadas com PB, a atividade apresentou um pico 48 h.a.i. (120 h.a.t.), seis vezes maior que nas plantas controle. Os tratamentos HI e VL promoveram picos menores quando comparados aos PB, mas significativamente maiores que as plantas tratadas com água. Nas plantas não inoculadas (Figura 7B), não houve diferença entre os compostos, mas todos promoveram aumento na atividade da APX quando comparados às plantas controle.

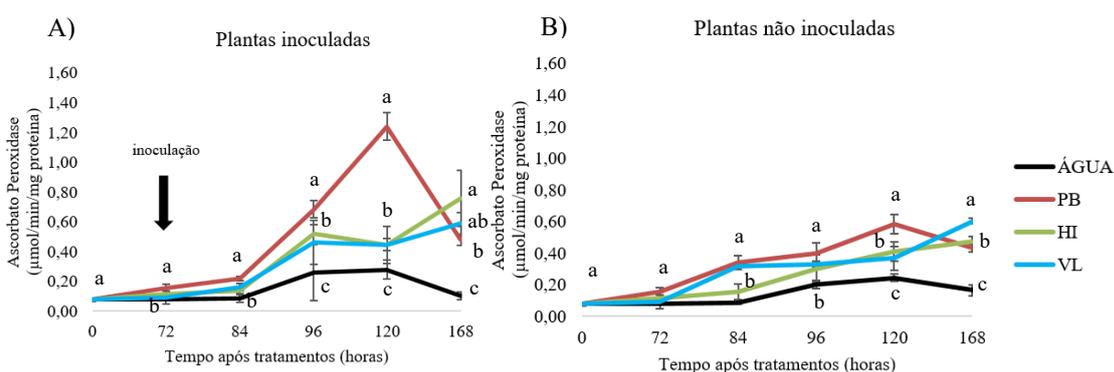


Figura 7. Atividade da ascorbato peroxidase em plantas tratadas com água, polissacarídeos de babosa (PB), hidrolato de melaleuca (HI) e vermicomposto líquido (VL), e inoculadas ou não inoculadas 3 dias depois dos tratamentos. Avaliações feitas antes dos tratamentos (0), antes da inoculação (72), e 84, 96, 120 e 168 horas após os tratamentos. Barras representam o erro padrão das médias. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos no mesmo tempo de avaliação, baseado no teste de Tukey ($p < 0,05$). Seta preta indica momento da inoculação com *Xanthomonas hortorum* pv. *gardneri*.

A atividade da fenilalanina amônia-liase (FAL) aumentou significativamente nas plantas tratadas com PB e inoculadas (Figura 8A), a partir de 12 h.a.i. (84 h.a.t.) até o final do tempo avaliado. Plantas tratadas com HI e VL tiveram atividades da FAL maiores que a das plantas testemunha somente 96 h.a.i. (168 h.a.t.) Nas plantas não inoculadas (Figura 8B), novamente PB promoveu maiores atividades da enzima durante todo período amostrado, enquanto VL e HI induziram aumento da FAL apenas em 168 h.a.t.

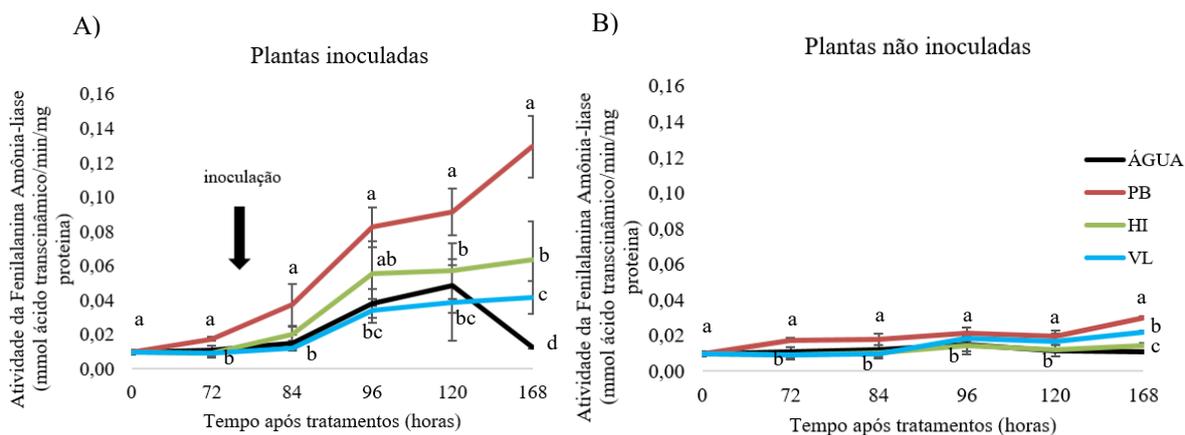


Figura 8. Atividade da fenilalanina amônia-liase em plantas tratadas com água, polissacarídeos de babosa (PB), hidrolato de melaleuca (HI) e vermicomposto líquido (VL), e inoculadas (A) ou não inoculadas (B) 3 dias depois dos tratamentos. Avaliações feitas antes dos tratamentos (0), antes da inoculação (72), e 84, 96, 120 e 168 horas após os tratamentos. Barras representam o erro padrão das médias. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos no mesmo tempo de avaliação, baseado no teste de Tukey ($p < 0,05$). Seta preta indica momento da inoculação com *Xanthomonas hortorum* pv. *gardneri*.

A atividade da nitrato redutase (NR) foi significativamente maior nas plantas tratadas com o vermicomposto e com os polissacarídeos de babosa, independente da inoculação. Em plantas inoculadas (Figura 9A), VL e PB promoveram aumentos de até 3 vezes na atividade da enzima, em relação ao controle, enquanto plantas tratadas com HI não diferiram da testemunha. Em plantas não inoculadas (Figura 9B) percebeu-se aumento significativo da atividade da NR a partir de 3 dias da aplicação de qualquer um dos compostos.

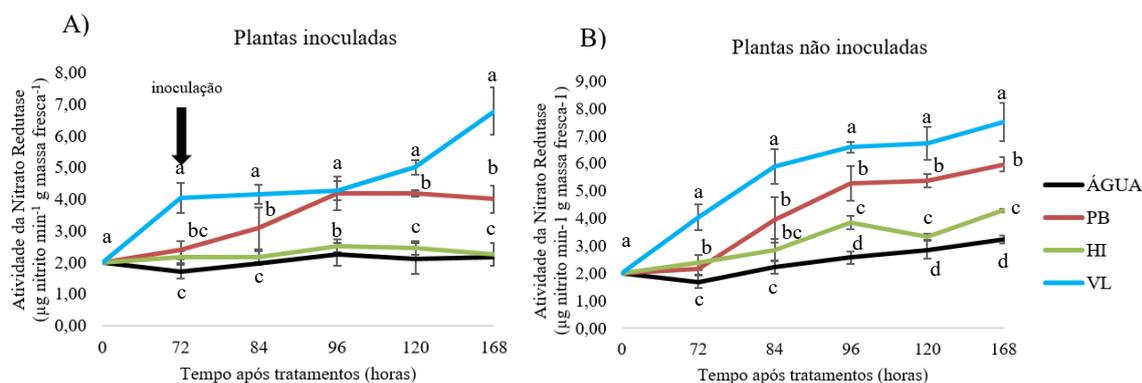


Figura 9. Atividade da nitrato redutase em plantas tratadas com água, polissacarídeos de babosa (PB), hidrolato de melaleuca (HI) e vermicomposto líquido (VL), e inoculadas (A) ou não inoculadas (B) 3 dias depois dos tratamentos. Avaliações feitas antes dos tratamentos (0), antes da inoculação (72), e 84, 96, 120 e 168 horas após os tratamentos. Barras representam o erro padrão das médias. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos no mesmo tempo de avaliação, baseado no teste de Tukey ($p < 0,05$). Seta preta indica momento da inoculação com *Xanthomonas hortorum* pv. *gardneri*.

4.4 DISCUSSÃO

A mancha bacteriana pode ser devastadora e responsável por grandes perdas econômicas em culturas como a do tomate. Essa doença tem como sintomas lesões necróticas, que diminuem a área foliar fotossinteticamente ativa, comprometendo o desenvolvimento das plantas e a sua produtividade. A nível celular e molecular, após a infecção, a planta sofre com aumento de EROs e danos oxidativos, enquanto possivelmente reprograma a transcrição de genes de defesa que codificam proteínas e aumentam as atividades de enzimas, resultando nas respostas de defesa da planta. Os compostos naturais possuem potencial para o controle de doenças em plantas, devido uma ampla variedade de princípios bioativos e seus diferentes modos de ação, que melhoram o metabolismo primário e ativam o sistema de defesa da planta, fazendo com que ela responda de maneira mais eficiente ao ataque de patógenos.

No presente estudo, em ensaios *in vitro*, o hidrolato de melaleuca (HI) reduziu significativamente a formação de biofilme bacteriano de *X. hortorum* pv. *gardneri*. O Terpinen-4-ol, que detêm a principal atividade antimicrobiana da *Melaleuca alternifolia*, atua comprometendo a integridade da membrana celular, provocando perda de material intracelular, incapacitando a célula de manter a homeostase e a respiração (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006). Nos experimentos com plantas, o tratamento prévio com HI reduziu em média 78% a severidade da mancha bacteriana quando comparada às plantas controle e os autores atribuíram ao possível potencial antimicrobiano do terpinen-4-ol. O óleo essencial de melaleuca, do qual o HI é extraído, é registrado no MAPA como bactericida e

fungicida bioquímico para diversas culturas, entre elas, o tomate. O óleo essencial foi considerado possível indutor de resistência por aumentar as atividades de enzimas de defesa e reduzir a severidade de da mancha angular em morangueiros (LUIZ et al., 2017). A atividade da FAL no presente estudo foi aumentada apenas em 168 horas após a pulverização do HI, tanto em plantas inoculadas quanto não inoculadas. O sistema antioxidante enzimático das plantas tratadas com o hidrolato mostrou ser eficiente no processo de detoxificação de EROs após o estresse oxidativo causado pela infecção do patógeno, provocando o aumento significativo da atividade de enzimas como a catalase e ascorbato peroxidase, possivelmente devido ao terpinen-4-ol e demais componentes presentes na melaleuca, como o γ -terpineno e α -terpineno, que são reconhecidamente compostos antioxidantes (BEN HSOUNA et al., 2017; GONZALEZ-BURGOS; GOMEZ-SERRANILLOS, 2012).

Os polissacarídeos da babosa (PB) inibiram em média 30% a formação do biofilme de *Xanthomonas* quando utilizados em maiores concentrações, possivelmente devido à presença do polissacarídeo acemanana, principal ativo antimicrobiano. Apesar de menor atividade antimicrobiana que o hidrolato, nos experimentos com plantas de tomate, os polissacarídeos promoveram maior redução na severidade da mancha bacteriana, 84% contra 79% do hidrolato, em média. A babosa possui mais de 75 ingredientes ativos como enzimas, vitaminas, lignina, aminoácidos e ácido salicílico (FEMENIA et al., 1999; CHOI; CHUNG, 2003; WICHTL, 2004; HABEEB et al., 2007; PANDEY; MISHRA, 2010), que poderiam estar relacionados ao controle do patógeno nos tecidos vegetais, porém, mais estudos são necessários.

O tratamento prévio das plantas de tomate com PB reduziu o estresse oxidativo causado pela posterior infecção por *Xanthomonas*, pois apresentaram quantidades menores de H₂O₂ e extravasamento de MDA, e isso pode ser explicado possivelmente pelo potencial antioxidante dos polissacarídeos, bem como, uma possível barreira física protetora ao serem pulverizados os polissacarídeos nas folhas, antes da inoculação. Em plantas não inoculadas, a pulverização dos PB aumentaram a peroxidação de lipídeos, possivelmente devido algum componente químico presente nos polissacarídeos com potencial de degradação de membranas.

O sistema antioxidante das plantas deve ser um sistema eficiente para detoxificar os radicais livres que causam danos às células. Um aumento na atividade das enzimas antioxidantes reduz a extensão dos danos oxidativos e restaura o equilíbrio fotossintético causado pela produção de lesões bacterianas. Neste estudo, os tomateiros tratados previamente com PB, exibiram aumento significativo nas atividades da CAT e da APX em 12 e 48 h.a.i.,

sugerindo uma resposta rápida e espacialmente distribuída na célula vegetal. Esse aumento promovido pela babosa nas plantas inoculadas foi mais expressivo e ocorreu antes em relação às plantas tratadas com HI, sugerindo que o estresse oxidativo em resposta à infecção durou menos tempo e possivelmente, causou menos danos.

Os PB foram o composto natural que atuou também por ação indireta de moléculas elicitoras que ativaram as respostas de defesa das plantas, como o aumento da atividade da FAL. Esta enzima está envolvida no primeiro passo da síntese dos fenilpropanóides, convertendo fenilalanina em ácido transcinâmico, e na síntese de compostos como fitoalexinas e substâncias envolvidas na biossíntese de lignina, que confere maior resistência à parede celular das plantas aos patógenos (NAKAZAWA et al., 2001; ZHAO et al., 2005). No presente estudo, nas plantas tratadas com PB, houve um aumento significativo e crescente das atividades da FAL a partir de 12 h.a.i., mostrando que as suas respostas de defesa foram ativadas rapidamente por estarem em estado de *priming* após o reconhecimento de algum elicitor presente nos polissacarídeos.

As plantas tratadas com PB apresentaram valores aumentados de altura e biomassa da parte aérea em relação às testemunhas. Tanto em plantas inoculadas como não inoculadas, os polissacarídeos duplicaram a atividade da nitrato redutase (NR), enzima que é aumentada quanto maior a quantidade de nitrogênio que é absorvido e incorporado pela planta, resultando em maior produção de compostos nitrogenados, proteínas e, conseqüentemente, aumentando a biomassa das plantas (TAIZ; ZEIGER, 2013). Este resultado, até onde se sabe, é o primeiro relato dos polissacarídeos de babosa promovendo o crescimento de plantas. Os autores sugerem ainda que a promoção de crescimento proporcionada pelos PB esteja também relacionada à redução dos danos oxidativos e às altas atividades de enzimas antioxidantes expressas logo após a infecção do patógeno, deixando a planta menos exposta ao estresse e aos danos no aparato fotossintético que os demais compostos.

O vermicomposto líquido (VL) foi o composto natural mais eficaz no controle da mancha bacteriana em tomateiros, com o aparecimento dos sintomas mais tardiamente e com menor intensidade, sendo que as lesões não ultrapassaram 6% da área foliar. Neste caso, a redução da severidade pode estar relacionada diretamente ao aporte via pulverização foliar de microrganismos benéficos e antagonistas a *Xanthomonas*, já que o VL foi o composto que apresentou a menor atividade antimicrobiana e menor ativação das enzimas de defesa.

Em estudos sobre o controle de doenças por vermicomposto, o mecanismo de ação proeminente foi de natureza biológica e não química (SZCZECZ, 1999; SIMSEK-ERSAHIN et al., 2009) pois o processo de vermicompostagem aumenta a quantidade e a diversidade de

microrganismos benéficos que competem por nutrientes, possuem potencial antimicrobiano e/ou parasitam os patogênicos (PIETERSE et al., 2014; BAUM et al., 2015). Para Yattoo et al. (2021) a aplicação de vermicomposto líquido tem um enorme potencial para proteger as plantas de doenças foliares pelo revestimento das superfícies das folhas, reduzindo os locais disponíveis para infecção por patógenos. A severidade da mancha bacteriana pode ser influenciada pelo nível de concentração de macronutrientes e micronutrientes no solo, afetando a expressão de genes de resistência a doenças de plantas na via de resistência adquirida sistêmica (SAR) (DUTTA et al., 2017). Segundo Schiavon et al. (2010), a aplicação de vermicomposto em tomateiros pode reduzir a incidência de *Phytophthora infestans* em campo e induzir a resistência sistêmica pelo aumento da expressão da FAL. Olivares et al. (2015) registraram aumento da enzima FAL após a aplicação foliar de vermicomposto em folhas de tomateiro, mesmo estes não sendo posteriormente inoculados. No presente estudo, o VL causou alteração na atividade da FAL apenas após 96 h.a.i.

O vermicomposto líquido pulverizado nas folhas de tomate aumentou a peroxidação lipídica e o conteúdo de peróxido de hidrogênio nas plantas não inoculadas. Esse aumento indica que a aplicação de compostos naturais também pode causar estresse oxidativo à planta, possivelmente devido à presença de compostos fenólicos em sua composição. Por outro lado, plantas tratadas com VL e posteriormente inoculadas mostraram uma melhora no sistema antioxidante, através do aumento da atividade da catalase e ascorbato peroxidase.

Altas atividades da enzima nitrato redutase (NR) estão relacionadas a altas produtividades nas culturas, já que é a enzima chave no metabolismo do nitrogênio, constituinte da molécula de clorofila, ácidos nucleicos, aminoácidos e proteínas (TAIZ; ZEIGER, 2013) e um dos elementos essenciais para a planta, destacando-se como um dos principais componentes da biomassa. No presente estudo a atividade da NR em plantas tratadas com VL foi quase 4 vezes maior do que nas plantas controle inoculadas. Esses resultados corroboram com o aumento significativo da biomassa da parte aérea e das raízes, e do crescimento em altura, independente da inoculação.

Alguns autores recomendam que agricultores apliquem essas soluções líquidas provenientes de vermicomposto diretamente nas folhas como um método de proteção de cultivo simples, barato e ecológico com alto potencial de rendimento (RAVINDRAN et al. 2019; ASLAM et al. 2020). Para Hernandez et al. (2014), a aplicação foliar de substâncias húmicas solúveis composta por moléculas orgânicas mistas, heterogêneas e pequenas é apropriada para a prática da agricultura orgânica urbana. No estudo de Blouin et al. (2019), a adição de vermicomposto aumentou em média 26% a produtividade do tomate, a biomassa da

raiz e da parte aérea em 57 e 78%, respectivamente. No presente estudo, pode-se inferir que o VL promoveu aumentos na capacidade de absorção e assimilação de nutrientes, na capacidade antioxidante e nas taxas fotossintéticas, fornecendo às plantas melhores condições fisiológicas e maior resistência a estresses bióticos e abióticos.

Com todo o exposto acima, podemos dizer que os compostos naturais testados neste estudo representam uma alternativa eficiente no controle da mancha bacteriana em tomateiros, promovendo o crescimento, atenuando os danos oxidativos e/ou induzindo a resistência das plantas ao ataque de uma ampla gama de patógenos.

4.5 CONCLUSÃO

Os compostos naturais polissacarídeos de babosa, hidrolato de melaleuca e o vermicomposto líquido controlam a mancha bacteriana em tomateiros através de variados modos de ação, incluindo potencial antimicrobiano, redução dos danos oxidativos e aumento das atividades de enzimas antioxidantes e de defesa rapidamente após a infecção do patógeno. Além disso, alguns dos compostos também promoveram o crescimento das plantas inoculadas, tornando-se uma solução sustentável no manejo integrado de doenças em plantas, que beneficia também o meio ambiente e otimiza a produção de alimentos saudáveis.

4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROFIT. **Departamento de Defesa e Inspeção Vegetal. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.** Agrofit online. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/agrofit/>. Acessado em 11 de agosto de 2021.

ADAM, A.; FARKAS, T.; SOMLYAI, G.; HEVESI, M.; KIRALY, Z. Consequence of $\bullet\text{O}_2$ - generation during a bacterially induced hypersensitive reaction in tobacco: deterioration of membrane lipids. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 34, n. 1, p. 13-26, 1989.

AGUIAR, T. de. **Frações polissacarídicas de fungos (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pleurotus ostreatus* e *Lentinula edodes*) na indução de resistência em tomateiro (*Solanum lycopersicum*) contra *Xanthomonas gardneri*.** 146 f. Tese (Doutorado) - Curso de Agronomia, Recursos Genéticos Vegetais, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 373-399, 2004.

ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Biology**, v.50, n. 1, p. 601-639, 1999.

BAKER, N. R. (2008). Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis *In Vivo*. **Annual Review of Plant Biology**, 59(1), 89–113. doi:10.1146/annurev.arplant.59.03.

BALDOTTO, M. A., CANELLAS, L. P., CANELA, M. C., SIMÕES, M. L., MARTINETO, L., FONTES, M.P.F.; VELLOSO, A. C. X. (2007) Propriedades redox e grupos funcionais de ácidos húmicos isolados de adubos orgânicos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 3:465-475.

BARBOSA, M. R.; SILVA, M. M. A.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; CAMARA, T. R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, p. 453-460, 2014.

BECKERS, G. J. M.; SPOEL, S. H. Fine-tuning plant defence signalling: salicylate versus jasmonate. **Plant Biology**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2006.

BEN HSOUNA, A.; BEN HALIMA, N.; SMAOUI, S.; HAMDI, N. Citrus lemon essential oil: Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities with its preservative effect against *Listeria monocytogenes* inoculated in minced beef meat. **Lipids in Health and Disease**, v. 16, n. 1, p. 1–11, 2017.

BESTFLEISCH M, MÖHRING J, HANKE M-V, PEIL A, FLACHOWSKY H, 2012. Resistance and systemic dispersal of *Xanthomonas fragariae* in strawberry germplasm (*Fragaria L.*). **Plant Breeding** 133, 115– 20.

BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. Jaguariúna. **Embrapa Meio Ambiente**, 341 p. 2009.

BRADFORD, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem** 72:248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

BOLLER, T.; FELIX, G. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. **Annual Review of Plant Biology**, v. 60, p. 379-406. 2009.

CARSON, C.F.; HAMMER, K.A.; RILEY, T.V. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. **Clin. Microbiol. Reviews**, v.19, n.1, p.50-62, 2006.

CONRATH, U.; PIETERSE, C.M.J.; MAUCH-MANI, B. Priming in plant- pathogen interactions. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 7, p. 210-216, 2002.

COSTA, J. R. et al. Ocorrência e caracterização do complexo de espécies causadoras da mancha bacteriana do tomateiro no Alto Vale do Rio do Peixe, SC. **Trop. plant pathol.**, Brasília, v. 37, n. 2, p. 149-154, Apr. 2012.

DUBEY, R. S. Metal toxicity, oxidative stress and antioxidative defense system in plants. In: GUPTA, S. D. (Ed.) *Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants*. Enfield: **Science Publishers**, p.178-203. 2010.

DU JARDIN P. (2015). Plant biostimulants: definition, concept, main categories and regulation. **Sci. Hortic.** 196, 3–14. [10.1016/j.scienta.2015.09.021](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021).

EMBRAPA/SEBRAE. Catálogo Brasileiro De Hortaliças: saiba como plantar e aproveitar 50 das espécies mais comercializadas no País. Brasília: EMBRAPA. 2010. 59p. Disponível em: <http://www.sebrae.com.br/setor/horticultura>. Acesso em: 27 set. 2021.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiologia plantarum**, v. 119, n. 3, p. 355-364, 2003.

FARMER, E. E.; RYAN, C. A. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. **The Plant Cell Online**, v. 4, n. 2, p. 129-134, 1992.

FRANZENER, G.; MARTINEZ-FRANZENER, A. S.; José Renato STANGARLIN, J. R.; CZEPAK, M. P.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F; SILVA CRUZ, M. E. 2007. **Atividade antibacteriana, antifúngica indutora de fitoalexinas de hidrolatos de plantas medicinais**. Semina: Ciências Agrárias, vol. 28, núm. 1, pp. 29-38. Universidade Estadual de Londrina Londrina, Brasil.

GONZALEZ-BURGOS, E.; GOMEZ-SERRANILLOS, M. P., Terpene compounds in nature: a review of their potential antioxidant activity. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 31, p. 5319–5341, 2012.

HEATH, L. R., PACKER, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 125:189 – 198.

IGAMBERDIEV, A. U.; LEA, P. J. The role of peroxisomes in the integration of metabolism and evolutionary diversity of photosynthetic organisms. **Phytochemistry**, v. 60, n. 7, p. 651-674, 2002.

INZÉ, D.; VAN MONTAGU, M. **Oxidative stress in plants**. Current Opinion in Biotechnology, v. 6, n. 2, p. 153-158, 1995.

ITAKO, A. T. **Avaliação de produtos químicos no controle e na indução de mecanismos bioquímicos de resistência à mancha bacteriana (*Xanthomonas perforans*) do tomateiro**. 2011. 104 f. Tese (Doutorado) - Curso de Agronomia, Agronomia (Proteção de Plantas), Faculdade de Ciência Agrônômicas, Botucatu, 2011.

JASSO DE RODRÍGUEZ, D. et al. Antifungal activity in vitro of *Aloe vera* pulp and liquid fraction against plant pathogenic fungi. **Industrial Crops and Products**, v.21, p.81–87, 2005.

KEPPLER, L. D.; BAKER, C. J. O₂ - initiated lipid peroxidation in a bacteria-induced hypersensitive reaction in tobacco cell suspensions. **Phytopathology**, v. 79, n. 5, p. 555-562, 1989

KOLLER, W. **Chemical approach to managing plant pathogens**. In: RUBERSON, J.R. (Ed.). Handbook of integrated pest management, Nova Iorque, cap. 1, p. 1-38. 1998.

LEE, J. K.; LEE, M. K.; YUN, Y. P.; KIM, Y.; KIM, J. S.; KIM, Y. S.; KIM, K.; HUAN, S. S.; LEE, C. K. Acemannan purified from *Aloe vera* induces phenotypic and functional maturation of immature dendritic cells. **International Immunopharmacology**, v.1, p.1275-1284, 2001.

LOPES, C. A.; QUEZADO-SOARES, A. M. Controle químico da mancha/bacteriana em tomateiro para processamento industrial. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 25, n.1, p.21/22, 1999.

LOZANO, C. et al. Evaluacion del efecto de hidrolatos de ajo (*Allium sativum*) y cebolla junca (*Allium fistulosum*) en el desarrollo de los hongos fitopatogenos *Botrytis alli* y *Sclerotium cepivorum*. **Fitopatologia Colombiana**, v.24, n.1, p.29-32, 2000.

LUIZ, C., FELIPINI, R.B., COSTA, M.E.B., DI PIERO, R.M., 2012. Polysaccharides from *Aloe barbadensis* reduce the severity of bacterial spot and activate disease-related proteins in tomato. **Journal of Plant Pathology** 94: 387-393.

LUIZ, C.; SCHAUFFLER, G.P.; LEMOS-BLAINSKI, J. M.; ROSA, D. J.; DI PIERO, R. M. 2016. Mechanisms of action of aloe polysaccharides and xanthan gum for control of black rot in cauliflower. **Sci Hort** 200:170–177.

LUIZ, C.; NETO, A. C. R.; FRANCO, P. O.; DI PIERO, R. M. 2017. Emulsions of essential oils and aloe polysaccharides: Antimicrobial activity and resistance inducer potential against *Xanthomonas fragariae*. **Trop. plant pathology**.

MADEJON, E., LOPEZ, R., MURILLO, J.M., CABRER, A.F., 2001. Agricultural use of three (sugar-beet) vinasse composts: effect on crops and chemical properties of a Cambisol soil in the Guadalquivir river valley (SW Spain). **Agric. Ecosyst. Environ.** 84, 55–65.
MAPA. Portaria N° 71, de 22 de fevereiro de 1999. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, n. 35, Seção 1, p. 9, 1999.

MCMANUS, P.; STOCKWELL, V. **Antibiotics for plant diseases control: silver bullets or rusty sabers.** APSnet Features Online. 2000. Disponível em: <http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/AntibioticsForPlants.aspx> Acesso em: jun.2021.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002.

MOLLER, I. M.; JENSEN, P. E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v 58, p. 459-481, 2007.

MUR, L. A. J.; SIMPSON, C.; KUMARI, A.; GUPTA, A. K.; GUPTA, K. J. 2016. Moving nitrogen to the centre of plant defence against pathogens. Review: part of a special issue on plant immunity. **Annals of Botany** 119: 703–709, 2016 doi:10.1093/aob/mcw179.

NASCIMENTO, A. D. R. **Ação de produtos químico in vitro, em mudas e em campo sobre a mancha bacteriana (*Xanthomonas perforans* e *X. gardneri*) em tomate para processamento industrial.** 2009,126 f. Tese (Doutorado em Agronomia: Produção Vegetal) – Escola de Agronomia E Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.

NASCIMENTO, A. dos R. et al. Controle químico da mancha bacteriana do tomate para processamento industrial em campo. **Horticultura Brasileira**, [s.l.], v. 31, n. 1, p.15-24, mar. 2013. FapUNIFESP (SciELO). http://dx.doi.org/10.1590/s0102_05362013000100003.

OLEA, F.; PEREZ-GARCIA, A.; CANTON, F.R. Up-regulation and localization of asparagine synthetase in tomato leaves infected by the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. **Plant and Cell Physiology**, 45: 770–780. 2004.

OLIVARES, F. L., AGUIAR, O. N., ROSA, R. C. C., CANELLAS, L. P. Substrate biofortification in combination with foliar sprays of plant growth promoting bacteria and humic substances boosts production of organic tomatoes. **Sci. Hortic.** 183, 100–108. 2015. doi: 10.1016/j.scienta.2014.11.012

PAGEAU, K.; REISDORF-CREN, M.; MOROT-GAUDRY, J.F.; MASCLAUX-DAUBRESSE, C. 2006. The two senescence-related markers, GS1 (cytosolic glutamine synthetase) and GDH (glutamate dehydrogenase), involved in nitrogen mobilization, are differentially regulated during pathogen attack and by stress hormones and reactive oxygen species in *Nicotiana tabacum* L. leaves. **Journal of Experimental Botany** 57: 547–557.

PIETROBELLI, S. R. **Óleos essenciais de espécies cítricas no controle da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi* H. Sydow & P. Sydow) da soja (*Glycine max* (L.)**

(Merrill). 2017. 49 f. TCC (Graduação) - Curso de Agronomia, Universidade Federal da Fronteira Sul., Laranjeiras do Sul, 2017.

QUEZADO-DUVAL, A.M. **Diversidade de *Xanthomonas* spp. associadas à mancha bacteriana em tomateiro para processamento industrial no Brasil.** 2003. 111 p. Tese (Doutorado em Agronomia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

QUEZADO-DUVAL, A. M., et al. Outbreaks of bacterial spot caused by *Xanthomonas gardneri* on processing tomato in central-west Brazil. **Plant Disease**, v.88, p.157-161, 2004.
QUEZADO-DUVAL, A.M.; LOPES, C.A. (2010) Mancha Bacteriana: Uma atualização para o sistema de produção integrada de tomate na indústria. 28 p. **Brasília: Embrapa Hortaliças**, (Circular Técnica 84).

RIGANO, L.A., SICILIANO, F., ENRIQUE, R., SENDÍN, L., FILIPPONE, P., TORRES, P.S. *et al.* Biofilm formation, epiphytic fitness, and c anker development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Molecular Plant–Microbe Interactions**, 20, 1222–1230. 2007.

ROMEIRO, R. S. **Indução de resistência em plantas a patógenos** In: PASCHOLATI, S. F; LEITE, B.; STANGARLIN, J. R. Cia P (Orgs). Interação planta/patógeno: fisiologia e biologia molecular. Piracicaba. Fealq. pp. 411/429. 2008.

ROMEIRO, R. D. S.; GARCIA, F. A. O. **Indução de resistência em plantas a patógenos por eliciadores de natureza bacteriana.** In: BETTIOL, W. e MORANDI, M. A. B. (Eds.). Biocontrole de Doenças de Plantas: uso e perspectivas. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 2009. 85-99 p.

SCHIAVON, M., PIZZEGHELLO, D., MUSCOLO, A., VACCARO, S., FRANCIOSO, O., NARDI, S. High molecular size humic substances enhance phenylpropanoid metabolism in maize (*Zea mays* L.). **J. Chem. Ecol.** 36, 662–669. 2010.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F., STANGARLIN, J.R., PASCHOLATI, S.F., 2008. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: Pascholati S.F., Leite B., Stangarlin J.R., Cia P. (eds). **Interação Planta Patógeno – Fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular**, pp. 227-248. FEALQ, Piracicaba, Brazil.

SHAH, Z. H.; REHMAN, H. M; AKHTAR, T.; ALSAMADANY, H.; HAMOOH, B. T.; MUJTABA, T.; DAUR, I.; AL ZHRANI, Y.; ALZHRANI, H. A. S.; ALI, S.; YANG, S. H.; CHUNG, G. (2018) Humic Substances: Determining Potential Molecular Regulatory Processes in Plants. **Front. Plant Sci.** 9:263. doi: 10.3389/fpls.2018.00263.

SHAO, X., CHENG, S., WANG, H., YU, D., & MUNGAI, C. (2013). The possible mechanism of antifungal action of tea tree oil on *Botrytis cinerea*. **Journal of Applied Microbiology**, 114(6), 1642-1649. PMID:23495848. <http://dx.doi.org/10.1111/jam.12193>

SIMSEK-ERSAHIN, Y. ECE, A. KARNEZ, E. Differential Effects of a Vermicompost Fertilizer on Emergence and Seedling Growth of Tomato Plants. **Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology** 5(11):1360. 2014.

STICHER, L.B.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J.P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Lawrence, v. 35, p. 235- 270, 1997.

TEDESCO, M. J. et al. **Analysis of soil, plants and other materials**. Porto Alegre: Department of Soils. UFRGS, 1995. 174p.

VALE, F.X.R.; FERNANDES FILHO, E.I.; LIBERATO, J.R. A software plant disease severity assessment. In: **International Congress of Plant Pathology**, 8., 2003, Christchurch. **Anais**. Christchurch: New Zealand, 2003. p.105 (Resumo).

VAN BREUSEGEM, F.; VRANOVA, E.; DAT, J. F.; INZE, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science*, v. 161, n. 3, p. 405-414, 2001.

VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v. 36, p. 453-483, 1998.

VELIKOVA, V., YORDANOV, I., EDREVA, A. 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. Protective role of exogenous polyamines. **Plant Sci**. 151:59–66.

YAGI, A.; KABASH, A.; OKAMURA, N.; HARAGUCHI, H.; MOUSTAFA, S. M.; KHALIFA, T. I. Antioxidant, free radical scavenging and anti-inflammatory effects of aloesin derivatives in *Aloe vera*. **Planta Medicinal**, v.68, p.957-960, 2002.

YAGI, A.; KABASH, A.; MIZUNO, K.; MOUSTAFA, S. M.; KHALIFA, T. I.; TSUJI, H. Radical scavenging glycoprotein inhibiting cyclooxygenase-2 and thromboxane A2 synthase from *Aloe vera* gel. **Planta Medicinal**, v.69, p.269-271, 2003.

YANG, W. et al. Mining tomato genome sequence databases for molecular markers: Application to bacterial resistance and marker assisted selection. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 695, p. 241/250, 2004.

YATOO, A. M.; NIAMAT, ALI.; ZAHOOR, A. B.; HASSAN, B. Sustainable management of diseases and pests in crops by vermicompost and vermicompost tea. A review. **Agronomy for Sustainable Development** 41: 7. 2021.

4.7 MATERIAL SUPLEMENTAR

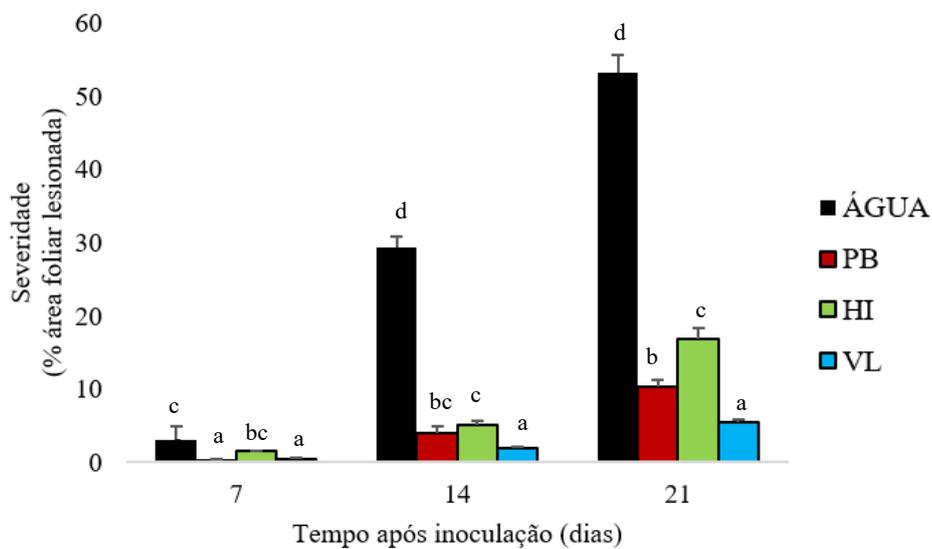


Figura Suplementar 1. Experimento 2 - Severidade da mancha bacteriana em plantas de tomate tratadas com água destilada, polissacarídeos da babosa (PB) a 5 mg mL^{-1} , hidrolato de melaleuca (HI) a $50 \mu\text{l mL}^{-1}$ e vermicomposto líquido (VL) a $10 \text{ mg COT mL}^{-1}$, inoculadas com *X. hortorum* pv. *gardneri* 3 dias após os tratamentos. A avaliação da doença foi realizada aos 7, 14 e 21 dias após a inoculação. Barras representam o erro padrão das médias. Letras diferentes indicam que os valores médios são significativamente diferentes no mesmo tempo baseados no teste de Tukey, $p < 0,05$.

**5 CAPÍTULO III: EXTRATOS E FRAÇÕES DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS
REDUZEM A SEVERIDADE DA MANCHA BACTERIANA EM TOMATEIROS,
MELHORAM O METABOLISMO PRIMÁRIO E ATIVAM O SISTEMA DE DEFESA
DAS PLANTAS.**

Faccin, D.¹; Di Piero, R. M.¹

¹ Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Rodovia Admar
Gonzaga, 1346, Itacorubi, 88.034-001, Florianópolis, SC, Brasil.

Florianópolis, 2021.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar os modos de ação de extratos de vermicomposto líquido e frações das substâncias húmicas no bioestímulo e no controle da mancha bacteriana em tomateiros. Os tratamentos foram pulverizados em folhas de tomateiros, 3 dias antes da inoculação com *Xanthomonas hortorum* pv. *gardneri*, e consistiram em extratos bruto (EBNF) (10 mg COT mL⁻¹) e filtrado (EBF) (10 mg COT mL⁻¹) de vermicomposto líquido, e as frações das substâncias húmicas extraídas destes, os ácidos húmicos (AH) (4 mg COT mL⁻¹) e fúlvicos (AF) (4 mg COT mL⁻¹). A severidade da doença foi avaliada aos 7, 14 e 21 dias após a inoculação (d.a.i.) pela porcentagem da área foliar lesionada, quantificada em fotografias de folhas sintomáticas no software QUANT. As plantas previamente pulverizadas com os AH apresentaram a menor severidade da mancha bacteriana, 91% menor em relação à testemunha. As atividades de enzimas antioxidantes e de defesa foram avaliadas nos tempos 0 (antes da aplicação dos compostos nas plantas), 72 (momento da inoculação), 84, 96, 120 e 168 horas após a aplicação dos tratamentos (h.a.t.). A atividade da catalase em plantas previamente tratadas com AH e EBF apresentou um pico 10 vezes maior que nas plantas controle às 84 h.a.t. A ascorbato peroxidase teve suas atividades aumentadas em 3 vezes após 96 horas do tratamento com os AH. Ambas as atividades revelaram o aumento da capacidade antioxidante das plantas. A atividade da fenilalanina amônia-liase aumentou 3 vezes em 120 h.a.t. em plantas tratadas com AH e AF, revelando que houve o reconhecimento de moléculas elicitoras e a ativação dos mecanismos de defesa das plantas após a infecção do patógeno (72 h.a.t.). A atividade da NR aumentou em até 7 vezes em plantas tratadas com EBNF e inoculadas, e em 4 vezes nas plantas tratadas com AH e não inoculadas, mostrando a capacidade bioestimulante dos compostos, mesmo em plantas infectadas com a bactéria. Os AH foram a fração mais ativa na promoção de crescimento, sendo responsável pelos maiores aumentos da altura e da biomassa da parte aérea e das raízes. Os conteúdos de clorofila a, b e carotenoides aumentaram a partir das 12 horas da aplicação dos tratamentos, com destaque para as plantas tratadas com AH e AF. Isso foi corroborado pelo aumento dos teores de pigmentos, determinados pelo índice SPAD, e que mostraram a manutenção do verde das folhas tratadas com AH, mesmo quando estas apresentavam alguns sintomas da doença aos 168 h.a.t. Os AH foram a fração que promoveu o maior aumento na fluorescência máxima e na capacidade fotossintética dos tomateiros infectados com a bactéria. De maneira geral, os AH foram a fração mais bioativa e eficiente no controle da mancha bacteriana, na ativação das enzimas antioxidantes e de defesa, além de promoverem maior promoção de crescimento.

Palavras-chave: *Xanthomonas*, ácidos húmicos, ácidos fúlvicos, fenilalanina amônia-liase, nitrato redutase.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the modes of action of liquid vermicompost extracts and fractions of humic substances in biostimulus and bacterial spot control in tomato plants. Treatments were sprayed on tomato leaves 3 days before inoculation with *Xanthomonas hortorum* pv. *gardneri*, and consisted of crude (UFCE) (10 mg TOC mL⁻¹) and filtered (FCE) (10 mg TOC mL⁻¹) extracts of liquid vermicompost, and the fractions of humic substances extracted from these, humic (HA) (4 mg TOC mL⁻¹) and fulvic (FA) (4 mg TOC mL⁻¹) acids. Disease severity was evaluated at 7, 14 and 21 days after inoculation (d.a.i.) by the percentage of injured leaf area, quantified in photographs of symptomatic leaves in the QUANT software. Plants previously sprayed with HA showed the lowest bacterial spot severity, 91% lower than the control. Activities of antioxidant and defense enzymes were evaluated at times 0 (before application of the compounds to the plants), 72 (time of inoculation), 84, 96, 120 and 168 hours after the application of treatments (h.a.t.). Catalase activity in plants previously treated with HA and FCE peaked 10 times higher than in control plants at 84 h.a.t. Ascorbate peroxidase had its activities increased by 3 times after 96 hours of treatment with HA. Both activities revealed an increase in the plant's antioxidant capacity. The phenylalanine ammonia-lyase activity increased 3-fold in 120 h.a.t. in plants treated with HA and FA, revealing that there was recognition of elicitor molecules and activation of plant defense mechanisms after pathogen infection (72 h.a.t.). NR activity increased up to 7 times in plants treated with UFCE and inoculated, and up to 4 times in plants treated with HA and not inoculated, showing the biostimulating capacity of the compounds, even in plants infected with the bacteria. HA were the most active fraction in promoting growth, being responsible for the greatest increases in height and biomass of shoots and roots.

The chlorophyll a, b and carotenoids contents increased after 12 hours of application of the treatments, especially for plants treated with HA and FA. This was corroborated by the increase in pigment contents, determined by the SPAD index, which showed the maintenance of the green of the leaves treated with HA, even when they presented some symptoms of the disease at 168 h.a.t. HA was the fraction that promoted the greatest increase in maximum fluorescence and photosynthetic capacity of tomato plants infected with the bacteria. In general, HA were the most bioactive and efficient fraction in controlling bacterial stain, in

activating antioxidant and defense enzymes, in addition to promoting greater growth promotion.

Keywords: *Xanthomonas*, humic acids, fulvic acids, phenylalanine ammonia-lyase, nitrate reductase.

5.1 INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) está entre as hortaliças de maior relevância econômica e social no mundo. No Brasil, o cultivo se destaca como segunda solanácea mais cultivada, atingindo em 2017 4,3 milhões de toneladas em uma área de 66.191 hectares, com um rendimento de 67.648 quilogramas por hectare (IBGE, 2018). É um dos frutos de hortícolas mais consumidos no mundo e em função da crescente expansão do cultivo surgiram vários problemas fitossanitários, entre eles, muitas doenças bacterianas. As bacterioses são favorecidas quando o ambiente é adequado à disseminação e ao desenvolvimento dos patógenos, e quando as plantas hospedeiras não possuem mecanismos de defesa eficientes.

A mancha bacteriana é uma das doenças mais devastadoras em tomateiros e é causada por 4 linhagens de 3 espécies, sendo elas *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*, *X. euvesicatoria* pv. *perforans*, *X. hortorum* pv. *gardneri* e *X. vesicatoria* (CONSTANTIN et al., 2016; MORINIÈRE et al., 2020). Tem como sintomas iniciais pequenas manchas marrons, que evoluem para grandes áreas necrosadas com aspecto encharcado e até o desfolhamento. A nível celular, a infecção da bactéria provoca danos oxidativos devido ao aumento de espécies reativas de oxigênio, diminui o conteúdo de clorofilas, diminui as atividades fotossintéticas da planta, afetando o desenvolvimento e a produtividade das plantas de tomate. O controle desta doença é difícil devido à rápida disseminação por sementes e mudas contaminadas, à ausência de variedades com resistência satisfatória, à ausência de controle químico eficiente e que não agrida o meio ambiente, a saúde das plantas e dos animais.

Diversas alternativas de baixo custo e impacto ambiental têm surgido, como as substâncias húmicas de vermicomposto, os seus extratos brutos, filtrados e suas frações. Essas substâncias são conhecidas como bioestimulantes do crescimento vegetal (CANELLAS et al., 2015; BLOUIN et al., 2019) por aumentarem a capacidade de retenção de água e absorção de nutrientes pela planta (MADEJON et al., 2001; ALBIACH et al., 2001; ARANCON et al., 2004), influenciarem o transporte de íons, a atividade respiratória, o conteúdo de clorofilas, a síntese de ácidos nucleicos e a atividade de várias enzimas (NANNIPIERI et al., 1983; BALDOTTO et al., 2014; CANELLAS et al., 2015; SHA et al., 2018). Além disso, o vermicomposto contém nutrientes que estão disponíveis em formas acessíveis às plantas,

como fosfatos, nitratos, cálcio solúvel e potássio (JANGRA et al. 2019), além de conter reguladores de crescimento vegetal e uma grande quantidade e variedade de microrganismos benéficos (JOSHI et al. 2015; YATOO et al., 2021), principalmente quando compostado corretamente (AGUIAR et al., 2013). O vermicomposto têm apresentado também potencial no controle de doenças, por aumentarem a diversidade e quantidade da microbiota da planta e do solo, por alterarem a concentração e a alocação de nitrogênio nos tecidos vegetais (MUR et al., 2016; HOFFTAND et al., 2000), pela provável ativação de genes de defesa após reconhecimento nas membranas plasmáticas vegetais (MUNROE, 2007; SCHIAVON et al., 2010, OLIVARES et al., 2015) e pelo potencial antioxidante (SCHIAVON et al., 2010; PIZZEGHELLO et al., 2001; GARCÍA et al., 2014).

O ataque de patógenos induz a superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROs) em cloroplastos, peroxissomos e mitocôndrias, a qual resulta em danos oxidativos em proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (SCANDALIOS et al., 2000; FOYER; NOCTOR, 2003; BARBOSA et al., 2014). Danos no aparato fotossintético também provocam aumento de EROs (SOARES; MACHADO, 2007). Em pequenas quantidades, as EROs atuam como moléculas sinalizadoras em resposta a situações de estresse nas plantas, ativando genes envolvidos no metabolismo de defesa (BARBOSA et al., 2014; RECZEK; CHANDEL, 2015). Para reduzir o estresse oxidativo, as plantas possuem um sistema de defesa com mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos para desintoxicar as células (MOLLER et al., 2007; DINAKAR et al., 2012; LEHMANN et al., 2015). Algumas enzimas como as catalases (CAT) e a ascorbato peroxidase (APX) atuam na eliminação e homeostase de H₂O₂ em diferentes locais dentro das células e em momentos distintos, garantindo a detoxificação temporal e espacial das EROs (INZÉ; MONTAGU, 1995; ASADA, 1999; MITTLER, 2002; DUBEY, 2010).

Algumas enzimas vêm sendo estudadas como marcadores bioquímicos da indução de resistência (SCHIAVON et al., 2010; OLIVARES et al., 2015), entre elas, a fenilalanina amônia-liase (FAL), enzima responsável pela síntese de compostos fenólicos, fitoalexinas, e aumento da deposição de lignina nos tecidos das plantas (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2016). O aumento desta enzima está fortemente relacionado à invasão por patógenos, no entanto, também pode ser ativada pela presença de compostos elicitores (MAREK, 2018). Já a enzima nitrato redutase (NR) pode ser usada como marcador bioquímico do bioestímulo, fortemente relacionada com a produtividade das culturas pois é a primeira enzima no processo de assimilação de N nas plantas (PURCINO et al., 1994). Plantas

com alta atividade desta enzima teriam maior capacidade de assimilar o nitrato disponível, melhorando a nutrição e o desenvolvimento (BEEVERS; HAGEMAN, 1969). Além disso, o nitrogênio absorvido se destaca como um dos principais componentes da biomassa, e é importante constituinte das moléculas de clorofila, ácidos nucleicos, aminoácidos e proteínas (TAIZ; ZEIGER, 2013).

A diminuição da área verde das folhas causada pelas necroses da mancha bacteriana, representa uma diminuição nos conteúdos de clorofilas e carotenoides, que são constituintes do fotossistemas I e II (PSI e PSII), locais onde ocorrem a absorção de luz (CASIERRA-POSADA; PEÑA-OLMOS, 2015). Quanto maior a concentração destes pigmentos, maior é a absorção e transporte da energia solar pelos fotossistemas, convertendo-a em energia química, logo, maior é a eficiência fotossintética da planta (YEOM et al., 2014; RODRIGUES et al., 2016). Os carotenoides atuam como pigmentos acessórios da fotossíntese e também como antioxidantes no reparo de danos celulares, inclusive no aparato fotossintético, causados por radicais tóxicos devido a alterações metabólicas (SCHUELTER et al., 2003; CHAGAS, 2007). As análises de conteúdos de clorofilas a e b e carotenoides podem ser correlacionados com o Índice SPAD, que quantifica o “verde” da folha, ou o teor relativo de pigmentos (MARKWELL et al., 1995; GUIMARÃES et al., 1999).

As alterações fotossintéticas causadas por condições de estresse biótico refletem também na emissão de fluorescência da clorofila *a* (BRESTIC; ZIVCAK, 2013). A fluorescência da clorofila *a* é inversamente proporcional à atividade fotossintética da planta, ou seja, quanto maior a emissão de luz fluorescente, menor é a energia absorvida e direcionada para os processos fotoquímicos (KAUTSKY, 1934). A avaliação da fluorescência da clorofila é uma técnica não destrutiva que permite a análise qualitativa e quantitativa da absorção e aproveitamento da energia luminosa pelos PSI e PSII no momento de estresse (KRAUSE; WEIS, 1991). Os parâmetros fluorescência basal (F_0), fluorescência máxima (F_m) e fluorescência variável (F_v), bem como a relação F_v/F_m , que representa a eficiência fotossintética do PSII, podem informar o estado metabólico da planta durante a interação com os agentes patogênicos e o desenvolvimento da doença.

Para que se conheça as características e propriedades das substâncias húmicas (SH) e seus modos de ação no controle de doenças ou na promoção de crescimento, é recomendado o fracionamento da matéria orgânica, principalmente em ácidos húmicos e fúlvicos, frações mais bioativas (IHSS, 2014; CANELLAS; SANTOS, 2005). A regulação no metabolismo celular depende da existência de grupos funcionais-chave nas SH, que podem desencadear

respostas fisiológicas locais e sistêmicas positivas por meio de uma rede complexa de vias de sinalização semelhantes a hormônios (NARDI et al., 2021). A atividade biológica depende finamente de sua dosagem, origem, tamanho molecular, grau de hidrofobicidade e aromaticidade e distribuição espacial de domínios hidrofílicos e hidrofóbicos.

Os ácidos húmicos (AH) são associações de compostos predominantemente hidrofóbicos (cadeias polimetilênicas, ácidos graxos, esteroides) que são estabilizados em pH neutro por forças hidrofóbicas fracas. Os ácidos fúlvicos (AF) são pequenas moléculas hidrofílicas que possuem grupos funcionais suficientemente ácidos para manter os aglomerados fúlvicos dispersos em solução a qualquer pH. Os AH têm se mostrado a fração mais bioativa na promoção de crescimento que os AF (TREVISAN et al., 2010a, b; CANELLAS E OLIVARES, 2014), por isso muitos estudos aprofundam o conhecimento sobre a bioatividade dos AH.

Os AH afetam a formação de raízes laterais (CANELLAS et al., 2002; TREVISAN et al., 2010b; FAÇANHA et al., 2002) e adventícias (BALDOTTO; BALDOTTO, 2014a, b, c), o alongamento radicular (SILVA et al., 2008) e a formação de pelos radiculares (CANELLAS et al., 2011), aumentando a massa radicular e a área de superfície das raízes, contribuindo para maior absorção de água e de nutrientes (EYHERAGUIBEL et al., 2008). Na parte aérea, os AH estimulam incrementos do acúmulo de nutrientes foliares (CHEN; AVAID, 1990; BALDOTTO et al., 2009b; MORA et al., 2010), da biossíntese de clorofilas e carotenoides (TEJADA; GONZALEZ, 2003; BALDOTTO et al., 2009b; JANNIN et al., 2012), e do processo fotossintético (AMERI; TEHRANIFAR 2012; JANNIN et al., 2012), resultando em incrementos da biomassa vegetal (TEJADA; GONZALEZ, 2003; BALDOTTO et al., 2009b; 2014). Porém não se tem conhecimento ainda sobre qual extrato ou fração das substâncias húmicas tem maior bioatividade no controle de doenças, com maior contribuição no sistema antioxidante enzimático e de defesa das plantas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os modos de ação dos diferentes extratos e frações das substâncias húmicas de vermicomposto líquido envolvidos na promoção de crescimento e no controle da mancha bacteriana em tomateiros.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Material biológico

Os experimentos *in vivo* foram conduzidos em casa de vegetação do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Santa Catarina. A temperatura média durante os

experimentos foi de 23°C. Sementes de tomate Santa Cruz Kada foram semeadas em substrato Plantmax® e 15 dias após a semeadura, duas plântulas foram transferidas para vasos de 2L contendo substrato Carolina®. A bactéria *Xanthomonas hortorum* pv. *gardneri*, cedida pela empresa Sakata Seed Sudamerica LTDA, SAKATA®; e identificada por BOX-PCR no Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças da Embrapa, Brasília, DF, foi mantida a 25 °C em tampão fosfato de potássio (pH 7,0). A repicagem foi realizada em meio NA e as placas incubadas a 25 °C, durante 48h. A suspensão bacteriana foi ajustada a D.O._{600nm} = 0,6.

5.2.2 Obtenção e fracionamento das substâncias húmicas

A matéria prima do fracionamento foi o vermicomposto líquido (VL) resultante da decomposição da matéria orgânica (cascas de frutas, legumes, folhas secas), e uso de minhocas californianas. O VL passou por processo de maturação por pelo menos, 60 dias. A caracterização química, realizada no Laboratório de Solos do Centro de Pesquisa para Agricultura Familiar - Cepaf/Epagri, Chapecó, SC, mostrou que o VL apresenta 0,35% de N/mL e 10 mg Carbono Orgânico Total (COT) mL⁻¹. O VL foi diluído em água destilada (1:10; v:v), obtendo-se o extrato bruto não filtrado (EBNF). Este extrato bruto foi posteriormente filtrado em membrana milipore de 45 µm, resultando no extrato bruto filtrado (EBF). O pH das soluções finais do EBNF e BF foi de 6,7.

O extrato húmico total foi obtido e fracionado conforme Benites et al. (2003). Nas amostras de VL (~30 mg COT) foi adicionado NaOH 0,1 mol L⁻¹ (1:10, v:v), foram submetidas a agitação manual e deixadas em repouso por 24 horas. Após centrifugação a 2.000 g por 15 minutos, o sobrenadante foi recolhido e reservado. Repetiu-se o processo de extração a partir do material sólido resultante e o novo sobrenadante obtido foi reunido com o primeiro, obtendo-se o extrato húmico total.

Para o fracionamento do extrato húmico total, o pH foi ajustado para 1,0 com gotas de H₂SO₄ a 20%, e repouso de 18 horas para decantação. O precipitado foi filtrado a vácuo com membrana de 0,45 µm. Este filtrado foi completado para 100 mL com água pura, obtendo-se a fração dos ácidos fúlvicos (AF). Após feita a completa lavagem do filtro com solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ e este valor completado com água pura para 100 mL, obteve-se a fração dos ácidos húmicos (AH). O pH final das soluções foram 4,8 e 5,2 para AF e AH, respectivamente.

5.2.3 Aplicação dos tratamentos e inoculação

Plantas de tomate com cinco folhas definitivas foram pulverizadas com 10 ml de água destilada em toda a parte aérea, AH (4 mg COT mL⁻¹), AF (4 mg COT mL⁻¹), EBF (10 mg COT mL⁻¹) ou EBNF (10 mg COT mL⁻¹). Após 3 dias, as plantas foram inoculadas com *X. hortorum* pv. *gardneri* (D.O. 0,6; 600 nm) até o ponto de escorrimento. As plantas permaneceram em câmara úmida por 48 horas.

5.2.3.1 Avaliação da severidade

A severidade da doença foi quantificada pela porcentagem de área foliar lesionada das 3^o e 4^o folhas de plantas sintomáticas. As folhas foram fotografadas e analisadas pelo software QUANT (VALE et al., 2003). As avaliações foram feitas aos 7, 14 e 21 dias após a inoculação (d.a.i.) do patógeno. Os experimentos foram montados em blocos inteiramente casualizados, com 7 repetições por tratamento, sendo cada repetição um vaso com duas plantas. Os experimentos foram realizados duas vezes.

5.2.3.2 Análises enzimáticas

Amostras foliares foram coletadas antes da aplicação dos tratamentos (tempo 0) e às 72, 84, 96, 120 e 168 horas após os tratamentos. Cada tratamento consistiu em 7 repetições, sendo a unidade experimental um vaso contendo duas plantas.

Para o preparo dos extratos proteicos utilizados nas reações da CAT, APX e FAL, 700 mg de tecido foliar foram macerados em cadinho/pistilo de porcelana com 4 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,5, contendo EDTA 1 mM e PVPP 1%. As suspensões resultantes foram centrifugadas a 10.000 g a 4°C por 30 minutos. O sobrenadante foi utilizado como extrato proteico.

A atividade da ascorbato peroxidase (APX) foi determinada conforme metodologia descrita por Moldes et al (2008). A reação ocorreu a partir da adição de 50µL de extrato proteico em 650 µL de tampão fosfato de potássio 80 mM, pH 7,0, 100 µL de ascorbato 5 mM, 100 µL EDTA 1mM e 100µL de H₂O₂ 1 mM. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,8 mM cm⁻¹. As leituras foram realizadas em leitor de microplacas a 290 nm, durante 1 minuto. Os resultados foram expressos em nmol de ácido ascórbico min⁻¹ mg proteína⁻¹.

A atividade da catalase (CAT) foi determinada segundo Kraus et al. (1995), a 240 nm durante 1 minuto, com leituras a cada 4 segundos. A reação foi iniciada pela adição de 25 µl de extrato proteico em 10 ml de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 25 µl H₂O₂ 30%. Para calcular a atividade específica da enzima foi utilizado o coeficiente de extinção

molar do H_2O_2 ($39,4 \text{ mmol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e os resultados foram expressos em $\mu\text{mol peróxido de hidrogênio min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$.

A atividade da fenilalanina amônia-liase (FAL) foi determinada segundo Falcón et al. (2008). Como substrato, foi utilizada fenilalanina 50 mM em tampão borato de sódio 100 mM (pH 8,8). Em 450 μL do substrato foram acrescentados 50 μL do extrato proteico e a mistura incubada a 40 °C por 1 h. A reação foi interrompida pela adição de 200 μL de HCl 5 N e banho de gelo por 5 min. Foram adicionados 300 μL de água destilada e a absorbância da solução foi mensurada a 290 nm em leitor de microplaca. Os resultados foram plotados em curva padrão de ácido transcinâmico e expressos como $\text{mmol ácido trans-cinâmico mg proteína}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

Para análise da nitrato redutase (NR) foram triturados 1g dos tecidos foliares em cadinho de porcelana com uma solução tampão (1:3; v:v) de Hepes-NaOH 100 mM, pH 7,5, contendo solução de MgCl_2 a 5 mM e solução de ditioneitol a 1 mM (DTT). O extrato foi filtrado e clarificado por centrifugação a 20.000g por 15 min a 4°C, como o sobrenadante representando o extrato proteico. A atividade da enzima foi determinada pela adição de 400 μL de extrato proteico ao tampão fosfato de potássio 100 mM, contendo KNO_3 a 100 mM. A atividade foi medida espectrofotometricamente a 540 nm e a curva de calibração feita com concentrações conhecidas de NaNO_2 (LEWIS *et al.*, 1982). Os resultados foram expressos em $\mu\text{g nitrito min}^{-1} \text{ g massa fresca}^{-1}$.

A quantificação de proteínas totais das amostras foliares foi feita pelo método de Bradford (1976). Para a reação foram adicionados 193 μL do reagente a 7 μL do extrato proteico de cada amostra foliar. A solução foi incubada por 15 minutos em temperatura ambiente. Foram feitas leituras das absorbâncias em leitor de microplaca a 595 nm, que foram convertidos em concentração de proteína solúvel, e esta comparada às leituras de soluções padrão de albumina de soro bovino.

5.2.3.3 Análise de desenvolvimento

O crescimento foi estimado pela diferença entre altura final (após 21 dias da inoculação) e altura inicial (logo após transplante para o vaso). Ao final do experimento, as plantas foram separadas em raiz e parte aérea, secas em estufa a 60°C por 48 h e pesadas para estimar a biomassa. Os experimentos foram realizados duas vezes, cada tratamento com 7 repetições e a unidade experimental foi um vaso contendo duas plantas.

5.2.3.4 Conteúdo de clorofilas e carotenoides

Amostras foliares foram coletadas 12, 24 e 48 horas após o tratamento. A determinação dos níveis de clorofila a e b e de carotenoides foi feita conforme Lichtenthaler (1987). O limbo de cada folha foi separado do pecíolo, os segmentos foliares pesados e macerados em acetona 80%. Os extratos obtidos foram filtrados em balões de 50 ml, completando-se o volume com água destilada. A densidade ótica dos filtrados foi lida em leitor de microplacas a 663, 645 e 470 nm. Foram utilizadas 5 repetições por tratamento e a unidade experimental consistiu em um vaso com duas plantas. Os valores de absorbância das clorofilas e carotenoides foram usados nas fórmulas:

$$\text{Chl } a \text{ (mg g}^{-1} \text{ peso folha fresca)} = [12.7(\text{OD}663) - 2.69 (\text{OD}645)] \times V/1000 \times W$$

$$\text{Chl } b \text{ (mg g}^{-1} \text{ peso folha fresca)} = [22.9(\text{OD}645) - 4.68 (\text{OD}663)] \times V/1000 \times W$$

$$\text{Total Chl (mg g}^{-1} \text{ peso folha fresca)} = [20.2(\text{OD}645) + 8.02(\text{OD}663)] \times V/1000 \times W$$

$$\text{Carotenoides (mg g}^{-1} \text{ peso folha fresca)} = [1000(\text{OD}470) - 1,82(\text{OD}663) - 85,02(\text{OD}645)]/200$$

(Em que, OD = Densidade ótica, V = Volume de amostra, W = Peso da amostra)

5.2.3.5 Teores de pigmentos

Os pigmentos foliares foram quantificados em plantas tratadas com água destilada, AH, AF, EBF e EBNF nos tempos 0, 7, 14 e 21 d.a.i. A unidade experimental foi composta por 2 plantas por vaso e foram feitas 4 medições por vaso. Foram usadas 7 repetições por tratamento. O aparelho *Soil Plant Analysis Development* (SPAD-502) avaliou quantitativamente a intensidade do verde da folha, medindo as transmissões de luz a 650 nm, onde ocorre absorção de luz pela molécula de clorofila e a 940 nm, onde não ocorre absorção. Com estes dois valores, o equipamento calculou o índice SPAD, que é altamente correlacionado com o teor de clorofila da folha (MARKWELL et al., 1995; GUIMARÃES et al., 1999).

5.2.3.6 Fluorescência da clorofila a

As análises de fluorescência da clorofila foram feitas seguindo a metodologia descrita por Schreiber et al. (1986) e Genty et al. (1989), avaliando a emissão da fluorescência da clorofila a pela superfície superior das folhas nos tempos 0, 7, 14 e 21 d.a.i. Com o fluorímetro portátil MINIPAM (Walz, Alemanha) foram analisadas as plantas ambientadas no escuro por 30 min e após, feitas 4 medições por vaso. Foram avaliadas a fluorescência inicial (Fo), fluorescência máxima (Fm), variável (Fv) e a eficiência quântica do fotossistema II (ϕ PSII).

Os parâmetros foram obtidos e calculados de acordo com as seguintes fórmulas (Bilger et al., 1995; Walz, 1993):

$$\Phi \text{ PSII} = qP \times Fv'/Fm'$$

$$qP: Fm' - F_s / Fm' - F_0$$

em que :

F₀: fluorescência mínima com todos os centros de reação do PSII abertos, adaptado ao escuro (qP=1 e qN=0);

F_m: fluorescência máxima obtida quando todos os centros de reação do PSII estão fechados, adaptado ao escuro (qP=0 e qN=0);

F_v = (F_m-F₀): fluorescência variável máxima obtida em folhas adaptadas ao escuro;

F_s: fluorescência no “steady-state” (equilíbrio) (qP >0);

F_m': fluorescência máxima obtida em folhas adaptadas à luz;

F_v': fluorescência variável máxima obtida em folhas adaptadas à luz.

qP: "quenching" fotoquímico ou atenuação fotoquímica da fotossíntese;

φ PSII : eficiência quântica efetiva do transporte de elétrons pelo PSII.

5.2.4 Análises estatísticas

Os experimentos foram montados de acordo com o delineamento estatístico completamente casualizado, com cinco repetições por tratamento, exceto quando indicado. O teste de Levene ($\alpha \leq 0,05$) foi utilizado para verificar a homogeneidade das variâncias em todos os experimentos. A análise de variância, teste F (5%) e teste de Tukey ($p \leq 0.05$) foram usados quando apropriado. As análises foram realizadas em Python 3 (<https://www.python.org/>), com auxílio das bibliotecas Pandas e Bioinfokit (<https://github.com/reneshbedre/bioinfokit>). Os gráficos resultantes foram gerados em Excel 2013.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Controle da mancha bacteriana em tomateiros

O extrato bruto não filtrado (EBNF) e filtrado (EBF), a fração de ácidos fúlvicos (AF) e de ácidos húmicos (AH) reduziram a severidade da doença em 75%, 81%, 83% e 91%, respectivamente, aos 21 dias após a inoculação (Figura 1).

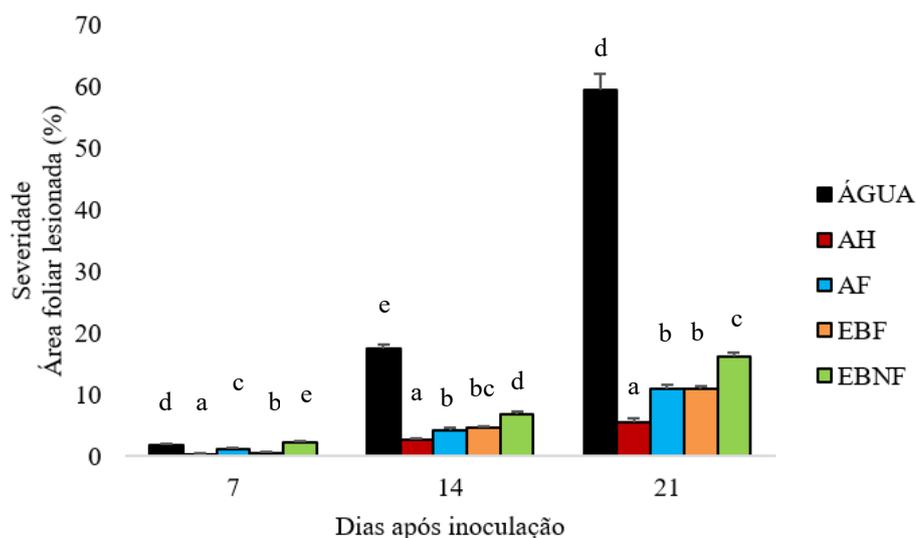


Figura 1. Severidade da mancha bacteriana em plantas de tomate tratadas com água destilada, ácidos húmicos (AH), ácidos fúlvicos (AF), extrato bruto filtrado (EBFIL), extrato bruto não filtrado (EBNFIL) e inoculadas com *X. hortorum* pv. *gardneri* 3 dias após os tratamentos. Barras representam o erro padrão das médias. Letras diferentes indicam que as médias são significativamente diferentes no tempo de avaliação, de acordo com o teste de Tukey, $p < 0,05$.

5.3.2 Atividade enzimática

Plantas de tomate previamente tratadas com AH, EBF e AF e posteriormente inoculadas (Figura 2A) apresentaram um pico de atividade da catalase 12 h. a. i. (84 h.a.t.). Um segundo pico de atividade, porém menor, foi registrado em 48 h. a. i. (120 h.a.t.). Nas plantas não inoculadas (Figura 2B) a atividade da catalase diferiu significativamente apenas nas plantas tratadas com AF nos tempos 96 h.a.t. e 168 h.a.t., e em plantas tratadas com EBF e EBNF 96 h.a.t.

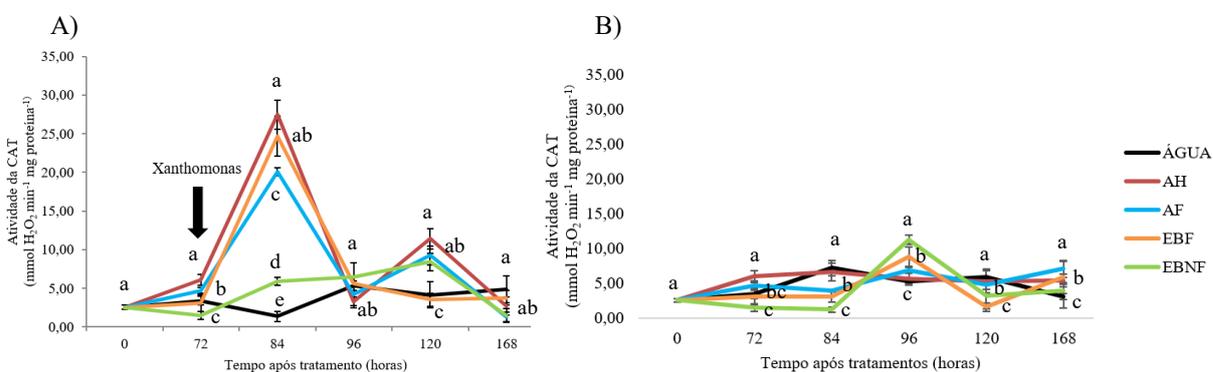


Figura 2. Atividade da catalase em plantas inoculadas (A) e não inoculadas (B), tratadas com água destilada (controle), ácidos húmicos (AH), ácidos fúlvicos (AF), extrato bruto filtrado (EBF) e extrato bruto não filtrado (EBNF). Barras representam o erro padrão das médias. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os

tratamentos no mesmo tempo de avaliação, baseado no teste de Tukey ($p < 0,05$). A seta preta representa o momento da inoculação com *X. hortorum* pv. *gardneri*.

A atividade da APX em plantas inoculadas (Figura 3A) revelou um pico 24 h.a.i. (96 h.a.t.) e queda acentuada em 48 h.a.i. (120 h.a.t.) em todas as plantas tratadas com as frações das SH, com destaque para os AH. Em plantas não inoculadas (Figura 3B) a atividade da APX oscilou entre os diferentes tratamentos, com aumento gradual ao longo do tempo.

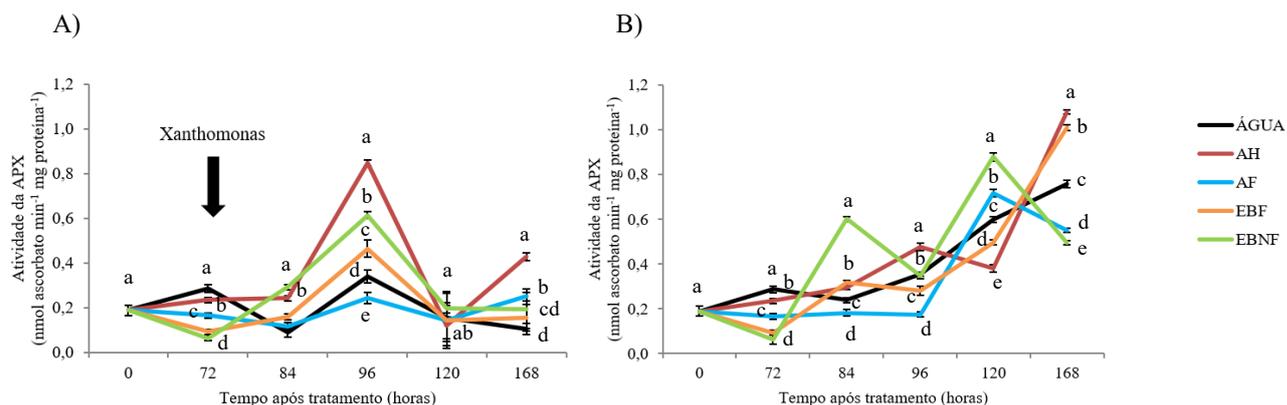


Figura 3. Atividade da ascorbato peroxidase em plantas inoculadas (A) e não inoculadas (B), tratadas com água destilada (controle), ácidos húmicos (AH), ácidos fúlvicos (AF), extrato bruto filtrado (EBF) e extrato bruto não filtrado (EBNF). Barras representam o erro padrão das médias. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos no mesmo tempo de avaliação, baseado no teste de Tukey ($p < 0,05$).

A atividade da FAL em plantas inoculadas (Figura 4A) aumentou após o tratamento com as frações das SH, principalmente em plantas previamente tratadas com AH e AF, até atingir um pico de atividade em 48 h.a.i. (120 h.a.t.). Em plantas não inoculadas (Figura 4B) a atividade da FAL atingiu um pico 96 h.a.t. nas plantas tratadas com AH, EBF e EBNF, e um aumento menos expressivo, mas também diferente significativamente, em 168 h.a.t após a aplicação de qualquer um dos tratamentos.

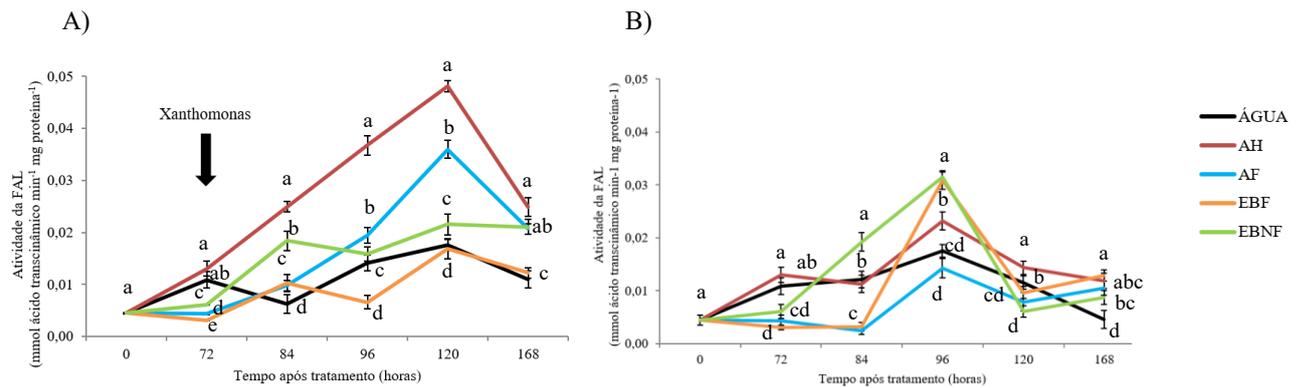


Figura 4. Atividade da fenilalanina amônia-liase em plantas inoculadas (A) e não inoculadas (B), tratadas com água destilada (controle), ácidos húmicos (AH), ácidos fúlvicos (AF), extrato bruto filtrado (EBF) e extrato bruto não filtrado (EBNF). Barras representam o erro padrão das médias. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos no mesmo tempo de avaliação, baseado no teste de Tukey ($p < 0,05$).

A atividade da nitrato redutase (NR) foi aumentada após a pulverização foliar de qualquer uma das frações, independentemente da inoculação. Em plantas inoculadas (Figura 5A) a nitrato redutase teve sua atividade aumentada em até 7 vezes após serem tratadas com EBNF, por exemplo, quando comparadas com as plantas controle. As plantas que não tiveram posterior contato com o patógeno (Figura 5B), ocorreram aumentos gradativos nas atividades da NR, atingindo valores maiores que nas plantas inoculadas.

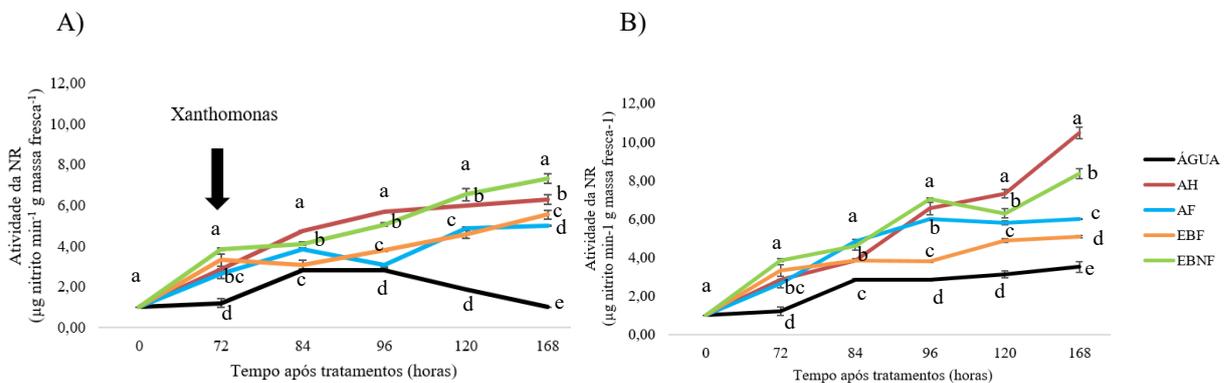


Figura 5. Atividade da nitrato redutase em plantas inoculadas (A) e não inoculadas (B), tratadas com água destilada (controle), ácidos húmicos (AH), ácidos fúlvicos (AF), extrato bruto filtrado (EBF) e extrato bruto não filtrado (EBNF). Barras representam o erro padrão das médias. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos no mesmo tempo de avaliação, baseado no teste de Tukey ($p < 0,05$).

5.3.3 Promoção de crescimento

As plantas previamente tratadas com AH e EBNF apresentaram os maiores valores de biomassa da parte aérea e das raízes, diferenciando significativamente dos demais tratamentos

e do controle (Figura 6A). A altura das plantas (Figura 6B) foi aumentada após qualquer um dos tratamentos aplicados, com destaque para os AH que promoveram aumento de até 66% no crescimento quando comparado às plantas controle.

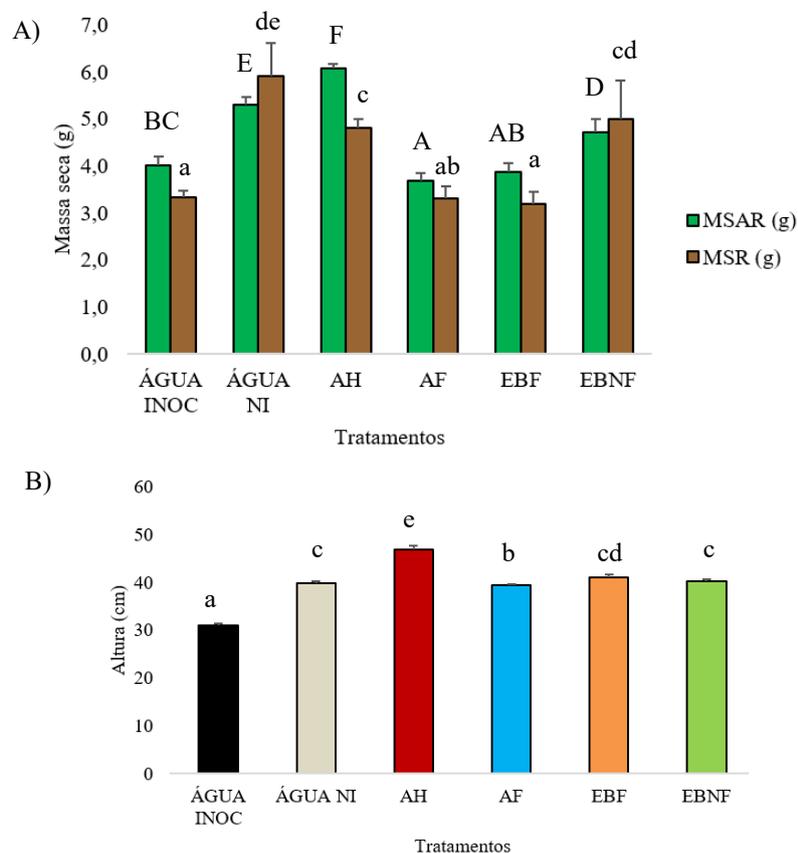


Figura 6. Desenvolvimento das plantas de tomates tratadas com água destilada (ÁGUA INOC – plantas inoculadas, ÁGUA NI – plantas não inoculadas), ácidos húmicos (AH), ácidos fúlvicos (AF), extrato bruto filtrado (EBF), extrato bruto não filtrado (EBNF) e inoculadas 3 dias após os tratamentos. Massa seca de parte aérea (MSAR) e massa seca de raízes (MSR) (A). Altura de plantas (B) avaliada desde o transplante até o final do experimento (21 dai). Barras representam o erro padrão das médias. Letras diferentes indicam que as médias são significativamente diferentes entre os tratamentos, de acordo com o teste de Tukey, $p < 0,05$.

5.3.4 Conteúdo de clorofilas e carotenoides

De maneira geral, foi registrado ao longo de 48 horas após a pulverização das frações de SH, aumentos nos conteúdos de clorofilas a, b e carotenoides (Figura 7A, B e C). As plantas tratadas com AF apresentaram os maiores conteúdos de clorofilas a e b em 24 e 48 horas após os tratamentos, enquanto os AH aumentaram os conteúdos de clorofilas 12 horas após o tratamento. Os valores de carotenoides (Figura 7C) aumentaram após 12 horas da aplicação

de qualquer uma das frações, estabilizando em valores 40% mais elevados em 24 e 48 horas, quando comparados com os carotenoides das plantas controle.

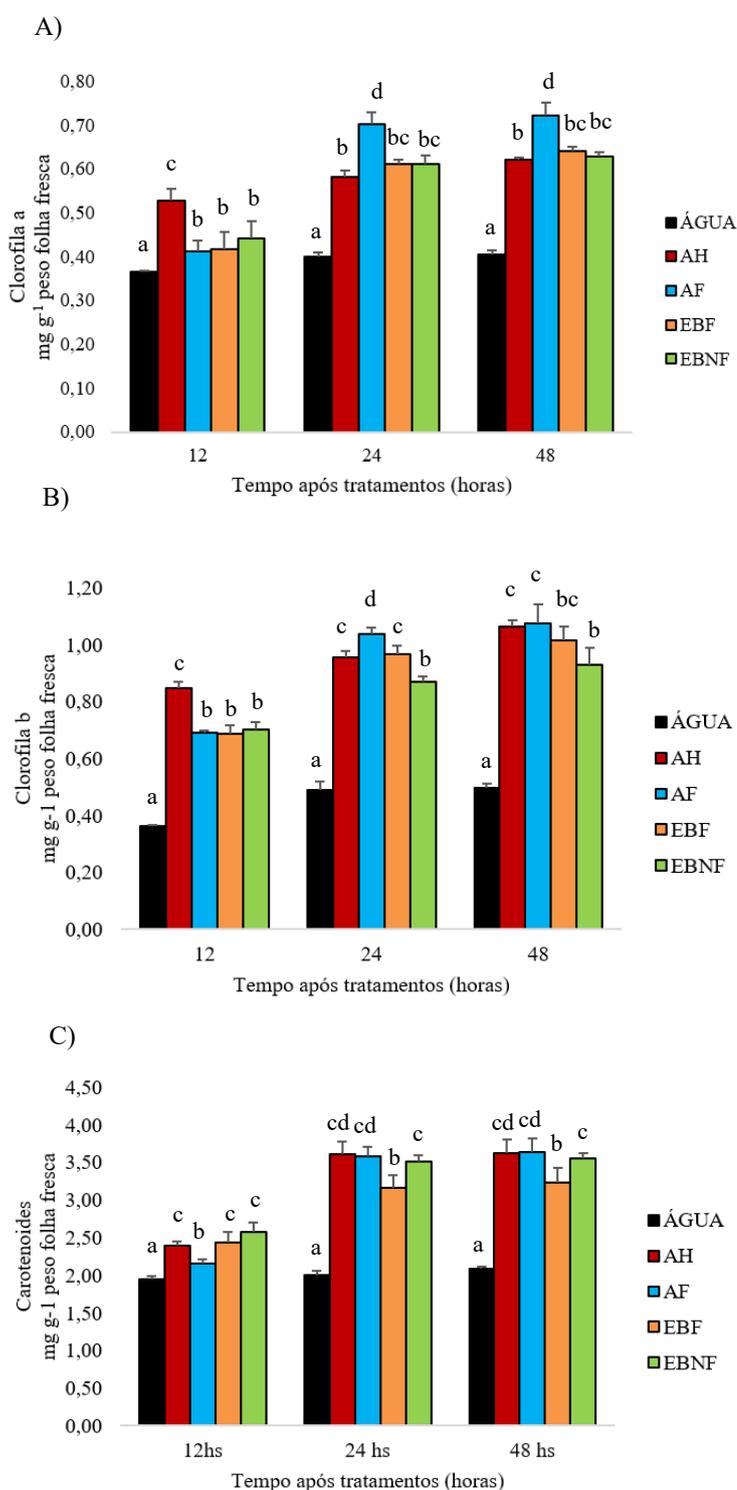


Figura 7. Conteúdo de clorofilas a (A), b (B) e carotenoides (C), 12, 24 e 48 horas após aplicação dos tratamentos água destilada, ácidos húmicos (AH), ácidos fúlvicos (AF), extrato bruto filtrado (EBF) e extrato bruto não filtrado (EBNF). Barras representam os erros padrões das médias. Letras diferentes indicam que as médias são significativamente diferentes no tempo de avaliação, de acordo com o teste de Tukey, $p < 0,05$.

5.3.5 Teores de pigmentos

Os resultados do índice SPAD (Figura 8) demonstraram diferença no conteúdo relativo de clorofila, ou verde da folha, das plantas tratadas com AH, principalmente 14 dias após a inoculação. Os demais tratamentos não apresentaram diferença significativa entre si quanto ao índice SPAD, mas foram maiores que nas plantas controle a partir do sétimo dia após a inoculação.

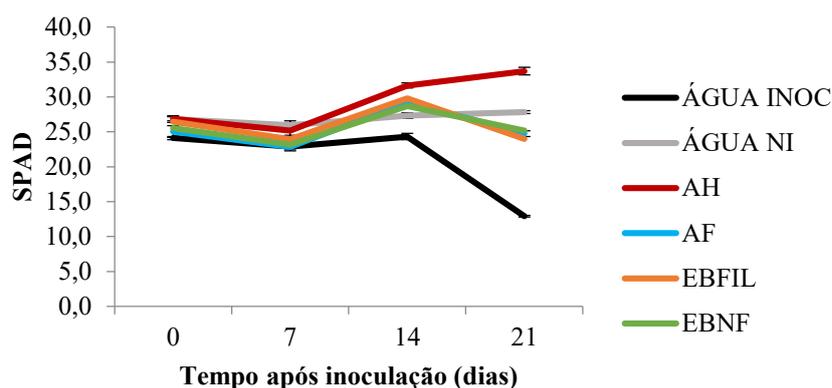


Figura 8. Índice SPAD nos tempos 0, 7, 14 e 21 dias após a inoculação nas plantas tratadas com água destilada, ácidos húmicos (AH), ácidos fúlvicos (AF), extrato bruto filtrado (EBF) e extrato bruto não filtrado (EBNF). Barras representam erros padrões das médias.

5.3.6 Fluorescência da clorofila *a*

Em 7 d.a.i., todas as plantas inoculadas apresentaram uma queda acentuada nos valores de F_0 , com posterior elevação nos valores, sendo que aos 21 d.a.i. a F_0 em plantas tratadas com EBF, por exemplo, aumentou em 20% quando comparadas às plantas controle inoculadas e em 10% a mais nas plantas não tratadas e não inoculadas (Figura 9A).

Os resultados mostraram que houve uma queda nos valores de F_m aos 7 d.a.i. em todas as plantas tratadas com as frações e posteriormente inoculadas (Figura 9B). Em plantas não tratadas e não inoculadas, o comportamento da F_m foi estável, não variando mais que 4% durante todo o período de avaliação. Em 21 d.a.i, as plantas tratadas com qualquer uma das frações tiveram os valores de F_m aumentados, chegando a um aumento de 22% nas plantas tratadas com AH e EBF, em relação às plantas controle inoculadas.

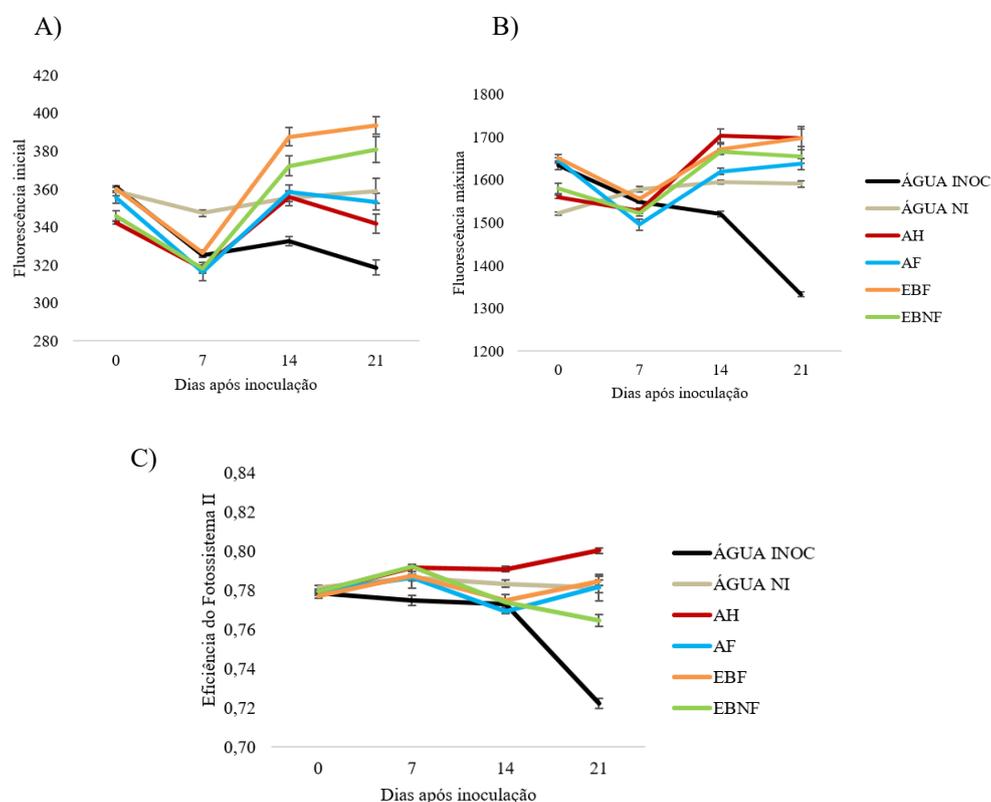


Figura 9. Fluorescência inicial (A), fluorescência máxima (B) e eficiência do fotossistema II (C), determinadas em folhas tratadas com água destilada, ácidos húmicos (AH), ácidos fúlvicos (AF), extrato bruto filtrado (EBF) e extrato bruto não filtrado (EBNF) e inoculadas 3 dias após tratamentos. Barras representam o erro padrão das médias.

A eficiência fotossintética (figura 9C), representada pela relação F_v/F_m , foi significativamente maior em plantas previamente tratadas com AH em comparação às plantas controle inoculadas, a partir de 7 d.a.i. As plantas tratadas com EBF ou AF apresentaram uma recuperação nos valores de F_v/F_m após 14 dias da inoculação, enquanto que as plantas controle inoculadas apresentaram uma queda acentuada na eficiência fotossintética neste período.

5.4 DISCUSSÃO

A mancha bacteriana é uma doença que tem como sintomas lesões necróticas que podem comprometer todas as partes verdes de plantas de tomate, causando em casos mais

severos, o desfolhamento e a desproteção dos frutos. Essa diminuição da área fotossinteticamente ativa compromete o desenvolvimento das plantas e a sua produtividade (LOPES; QUEZADO-SOARES, 1999; QUEZADO-DUVAL et al., 2005; ARAÚJO et al., 2010; MA et al., 2011; MILLER, 2012). Os extratos brutos e as frações das substâncias húmicas extraídas de vermicomposto são alternativas com potencial no controle da mancha bacteriana e na melhoria do estado fisiológico de plantas previamente tratadas e posteriormente infectadas com *Xanthomonas hortorum* pv. *gardneri*. Neste trabalho, os ácidos húmicos (AH) promoveram maior crescimento das plantas, maior capacidade de ativar enzimas antioxidantes e de defesa e, principalmente, maior redução da severidade da mancha bacteriana em comparação aos extratos brutos, de forma a representar a fração mais ativa das substâncias húmicas.

A severidade da doença foi reduzida nas plantas previamente tratadas todas as frações, sendo que os AH reduziram em média 91% quando comparada às plantas controle e, aos 21 d.a.i., e mantiveram as folhas de tomateiro com poucas e pequenas lesões e um estado geral da planta, saudável. O EBF apresentou o pior desempenho no controle da doença ao longo de todo experimento e isso poderia ser explicado pela menor quantidade de microrganismos presentes nesse extrato, os quais haviam sido filtrados pela membrana milipore durante o seu processo de obtenção. Esses microrganismos poderiam atuar como antagonistas ou apresentar moléculas ativadoras do sistema de defesa vegetal.

A maior bioatividade dos AH no controle de doenças em relação às demais frações das SH também foi relatada no estudo de Canellas et al. (2008), em que os AH aumentaram a exsudação de ácidos orgânicos, possivelmente envolvidos na redução de patógenos. Joshi et al. (2014) apresentaram uma lista de patógenos controlados através da aplicação de vermicomposto em plantas, como *Fusarium moniliforme* (MANANDHAR; YAMI, 2008), *Fusarium oxysporum* (NAKASONE et al. 1999), *Phytophthora nicotianae* (SZCZECH; SMOLINSKA, 2001), *Rizoctonia solani* (SIMSEK-ERSAHIN et al., 2009; ASCIUTTO et al., 2006) e inibição do crescimento micelial de *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotum* e *Corticium rolfsii*, em experimentos *in vitro* (NAKASONE et al., 1999). Segundo Jindo et al. (2020), as SH interferem no sistema de defesa das plantas através do aumento de microrganismos benéficos (MC LEAN ET AL., 2012; MOTTA E SANTANA, 2013; MOHAMADI ET AL., 2017), pela proteção UV (BITTON et al., 1972; MUELA et al., 2008; KAISER et al., 2019), pela interação direta com o patógeno (ZALLER, SEENIVASAN e SENTHILNATHAN, 2018; D'ADDABBO et al., 2019; LIU et al., 2019), aumentando o sistema de defesa da planta contra patógenos por meio da modulação de compostos químicos

(fenóis e carotenoides) e do aumento de enzimas antioxidantes e da rota dos fenilpropanoides (KESBA e EL-BELTAGI, 2012; OLIVARES et al., 2015; SCHIAVON et al., 2010).

No presente estudo, plantas inoculadas e previamente tratadas com os AH apresentaram atividades de catalase e de ascorbato peroxidase 26 e 4 vezes maior em relação à testemunha, exibindo picos 12 h.a.i e 24 h.a.i., respectivamente. Devido a essa resposta rápida, intensa e espacialmente distribuída na célula, pode-se inferir que a planta tenha detoxificado as EROS de maneira eficiente, permanecendo menos tempo em estresse e, conseqüentemente, sofrendo com menos danos oxidativos do que as plantas controle. Em plantas não inoculadas, a atividade da catalase, mesmo que significativamente menor que nas plantas inoculadas, aumentou em 96 h e 168 h após os tratamentos, enquanto que a APX teve sua atividade aumentada gradualmente, oscilando os picos entre os tratamentos, demonstrando que os mecanismos de defesa da planta estavam sendo ativados mesmo sem a presença do patógeno.

A enzima fenilalanina amônia-liase (FAL) é uma das mais importantes na resistência de plantas a patógenos, responsável pela síntese de compostos fenólicos, fitoalexinas, e maior deposição de lignina (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2016). No presente estudo, os AH e AF diferiram dos demais compostos na maioria das medições da atividade da FAL. Eles promoveram um pico de atividade 48 horas após a inoculação e posterior queda na atividade em 96 horas. Mesmo em plantas não inoculadas, o EBNF e o EBF promoveram picos de atividade da FAL 4 dias após os tratamentos, mostrando que a pulverização foliar do vermicomposto ativou as respostas de defesa da planta sem o contato com o patógeno, possivelmente devido ao potencial de moléculas elicitoras desencadarem a sinalização em cascata e ativarem os genes de defesa das plantas tratadas (MAREK, 2018).

Todas as frações das SH testadas aumentaram as atividades da enzima NR, tanto em plantas inoculadas, quanto não inoculadas posteriormente. As plantas inoculadas apresentaram menores valores da NR do que as plantas sem o posterior contato com o patógeno, possivelmente porque o N que deveria estar sendo assimilado pela planta e aumentando os valores da NR, estaria sendo redirecionado para o centro de defesa dos tomateiros infectados pela bactéria (MUR et al., 2016). Esta enzima está relacionada com a assimilação e incorporação de N pelas plantas (PURCINO et al., 1994), e conseqüentemente, assume um papel regulador no desenvolvimento das plantas e produtividade das culturas, visto que plantas com alta atividade desta enzima teriam maior capacidade de assimilar o nitrato

disponível, maior produção de compostos nitrogenados, proteínas e, como resultado, plantas bem nutridas e com maior biomassa (TAIZ; ZEIGER, 2013).

As plantas previamente tratadas com AH e EBNF apresentaram maiores incrementos de biomassa da parte aérea, das raízes e no crescimento em altura. Os AH são a fração amplamente estudada como a mais bioativa na promoção de crescimento em diversas culturas (TREVISAN et al., 2010 a,b; CANELLAS; OLIVARES, 2014; ABDEL-MAWGOUD et al., 2007; YILDIRIM, 2007). Os modos de ação dos AH estão relacionados aos grupos funcionais-chave que desencadeiam respostas fisiológicas locais e sistêmicas, são dependentes da dosagem, da origem, do tamanho molecular e do grau de hidrofobicidade. O AH usam alvos de ação nas plantas como transportadores de nutrientes, as H^+ -ATPases da membrana plasmática, as rotas hormonais, os genes/enzimas envolvidos na assimilação do nitrogênio, na divisão celular e no desenvolvimento (NARDI et al., 2021). O maior aporte de biomassa da raiz foi em plantas tratadas com o EBNF, e isso pode estar relacionado ao fato de que houve maior aporte de microrganismos benéficos no solo, fato também registrado no estudo de Canellas et al. (2015), que relatou modificações na morfologia das raízes de plantas tratadas com vermicomposto na fração mais bruta.

Plantas tratadas com qualquer um dos extratos ou frações mantiveram por mais tempo o verde das folhas, através do estímulo ao acúmulo de pigmentos fotossintetizantes e acessórios, como as clorofilas a, b e carotenoides, aumentadas a partir de 12 horas após a aplicação dos tratamentos. O aumento nos conteúdos de clorofilas representa mais energia luminosa absorvida e possivelmente transformada em energia química para a realização da fotossíntese. Os resultados do índice SPAD mostrou que ao final do experimento (21 d.a.i.) a maioria das folhas das plantas já apresentavam sinais de senescência ou sintomas avançados da doença, como amarelecimento, necrose e até desfolhamento, porém, as plantas tratadas com AH permaneceram verdes por mais tempo, provavelmente devido ao atraso do início dos sintomas da doença e ao potencial bioestimulante que garantiu elevada quantidade de pigmentos fotossintetizantes nos tecidos, maior crescimento e aporte de biomassa.

As medidas de fluorescência da clorofila são a principal ferramenta para análise da performance fotossintética da planta e seu estado fisiológico geral, obtida rapidamente e de maneira não destrutiva (SCHREIBER et al., 1998). A emissão da fluorescência permite obtermos informações sobre os processos fotoquímicos do fotossistema II (PSII) e quais os estados dos centros de reação, estes fortemente influenciados por fatores ambientais bióticos ou abióticos (BOLHÀR-NORDENKAMPF; OQUIST, 1993). Neste estudo, a F0 foi

semelhante em todas as plantas tratadas, diferindo apenas das plantas controle, que tiveram a F_0 reduzida, indicando o ganho que as plantas tratadas com bioestimulantes obtiveram, visto que valores reduzidos de F_0 indicam a redução da energia absorvida e distribuída aos centros de reação do PSII, e isso pode ser causado pelo baixo conteúdo de clorofilas, consequência dos danos causados pelos amarelecimento e necrose dos tecidos da planta doente. A F_m de plantas tratadas com AH e AF se destacou 14 e 21 dias após a inoculação do patógeno, mesmo enquanto as demais plantas já apresentavam decréscimo da F_m , possivelmente devido aos danos no aparato fotossintético causado pelas lesões características da mancha bacteriana. As plantas tratadas com AH e AF se destacaram pelo aumento gradativo da relação F_v/F_m já a partir de poucos dias após a inoculação até o final do experimento (21 d.a.i.), mostrando que as plantas não estavam sofrendo maiores danos nas taxas fotossintéticas, mesmo doentes. Nesses casos, os valores de eficiência fotossintética atingiram níveis considerados ótimos, próximos de 0,8. A capacidade ou eficiência fotossintética diminui conforme tamanho e severidade do dano sofrido pela planta, podendo levar à morte do tecido, ou podendo também ser recuperada em poucas horas ou dias, dependendo do estímulo. Essa recuperação parece ter acontecido com plantas tratadas com os AF, pois apresentaram uma queda na relação F_v/F_m 14 d.a.i. e, em 21 d.a.i recuperaram os elevados valores da eficiência do PSII.

5.5 CONCLUSÃO

O vermicomposto é uma eficiente alternativa para melhorar as condições fisiológicas de plantas de tomate e reduzir a severidade da mancha bacteriana, possivelmente pela indução de resistência das plantas e pelo maior aporte de microrganismos benéficos antagonistas ao patógeno. O fracionamento do material mostrou que os AH representam a fração mais ativa das substâncias húmicas, tanto na promoção de crescimento quanto no controle da doença.

5.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-MAWGOUD AMR; EL-GREADLY NHM; HELMY YI; SINGER SM. 2007. Responses of tomato plants to different rates of humic-based fertilizer and NPK fertilization. **Journal of Applied Sciences Research** 3: 169-174.

AGUIAR, N.O., OLIVARES, F.L., NOVOTNY, E.H. et al. Bioactivity of humic acids isolated from vermicomposts at different maturation stages. **Plant Soil** 362, 161–174 (2013). <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1277-5>

ALBIACH, R., CANET, R., POMARES, F., INGELMO, F., 2001. Organic matter components, aggregate stability and biological activity in a horticultural soil fertilized with different rates of two sewage sludges during ten years. **Bioresour. Technol.** 77, 109–114.

AMERI, A.; TEHRANIFAR, A. (2012) Effect of humic acid on nutrient uptake and physiological characteristic *Fragaria ananassa* var: *camarosa*. **Journal of Biological Environmental Science**, 6:77-79.

ARANCON, N.Q., EDWARDS, C.A., BIERMAN, P., WELCH, C., METZGER, J.D., 2004. Influences of vermicomposts on field strawberries: 1. Effects on growth and yields. **Bioresour. Technol.** 93, 145–153.

ARANCON, N. Q.; EDWARDS, C. A.; LEE, S.; BYRNE, R. (2006) Effects of humic acids from vermicomposts on plant growth. **European Journal of Soil Biology**, 42:65-69.

ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Biolog**, v.50, n. 1, p. 601-639, 1999.

ASLAM, Z.; AHMAD, A.; BELLITÜRK, K.; IQBAL, N.; IDREES, M.; REHMAN, W.U.; AKBAR, G.; TARIQ, M.; RAZA, M, RIASAT, S, UR; REHMAN, S (2020) Effects of vermicompost, vermi-tea and chemical fertilizer on morphophysiological characteristics of tomato (*Solanum lycopersicum*) in Suleymanpasa District, Tekirdag of Turkey. **Pure Appl Biol** 9:1920–1931. <https://doi.org/10.19045/bspab.2020.90205>

BALDOTTO, L.E.B.; BALDOTTO, M.A.; GIRO, V.B.; CANELLAS, L.P; OLIVARES, FL; BRESSAN-SMITH, R. (2009b) Desempenho do abacaxizeiro ‘Vitória’ em resposta à aplicação de ácidos húmicos durante aclimação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 33:979-990.

BALDOTTO, M. A.; BALDOTTO, L. E. B. **Humic Acids**. Ceres Journal [online]. 2014, v. 61, n. suppl [Acessado 6 Setembro 2021], pp. 856-881. Available: <<https://doi.org/10.1590/0034-737x201461000011>>. Epub 09 Jan 2015. ISSN 2177-3491. <https://doi.org/10.1590/0034-737x201461000011>

BALDOTTO, M.A.; CANELLAS, L.P.; CANELA, M.C.; SIMÕES, M.L., MARTIN-NETO L, FONTES, M. P. F.; VELLOSO, A.C.X. (2007) Redox properties and enabled groups of humic acids granted from organic fertilizers. **Revista Brasleira de Ciência do Solo**, 3:465-475.

BARBOSA, M. R.; SILVA, M. M.A.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; CAMARA, T. R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em planta. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.44, n.3, p.453-460, mar, 2014.

BENETTI, R.; BENETT, K. S. S.; ARRUDA, N.; BENETT, C. G. S.; SELEGUINI, A. Planting density and humic substances in tomato cultivation (*Solanum lycopersicum* L). **Revista de Agricultura Neotropical**, Cassilândia-MS, v. 5, n. 1, p. 75-81, jan./mar. 2018. ISSN 2358-6303.

BENITES, V.M.; MADARI, B.; MACHADO, P.L.O.A. 2003. **Extração e fracionamento quantitativo de substâncias húmicas do solo: um procedimento simplificado de baixo custo**. Comunicado Técnico 16, EMBRAPA Solos, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 7pp.

BILGER, W.; SCHREIBER, U.; BOCK, M. Determination of the quantum efficiency of photosystem II and of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. **Oecologia**, Berlin, v. 102, p. 425-432, 1995.

BLOUIN, M.; BARRERE, J.; MEYER, N.; LARTIGUE, S.; BAROT, S.; MATHIEU, J. (2019). Vermicompost significantly affects plant growth. A meta-analysis. **Agron Sust Dev** 39:34. <https://doi.org/10.1007/s13593-019-0579-x>.

BRADFORD, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem** 72:248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

BRESTIC, M.; ZIRVCAK, M. PSII fluorescence techniques for measurement of drought and high temperature stress signal in crop plants: protocols and applications. In: ROUT, G. R.; DAS, A. B. **Molecular Stress Physiology of Plants**. Bhubaneswar, India: Springer Dordrecht, p 87- 133, 2013.

BULGARI R, COCETTA G, TRIVELLINI A, VERNIERI P, FERRANTE A. 2015. Biostimulants and crop responses: a review. **Biol Agric Hortic**. 31:1–17. doi: 10.1080/01448765.2014.964649.

CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; OKOROKOVA-FACANHA, A. L.; FACANHA, A. R. (2002) Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots. **Plant Physiology**, 130:1951-1957.

CANELLAS, L. P.; SANTOS, G. A. (2005) **Humosfera: tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas**. Campos dos Goytacazes, UENF. 348p.

CANELLAS, L.P., ZANDONADI, D.B., BUSATO, J.G., BALDOTTO, M.A., SIMÕES, M.L., MARTIN-NETO, L. Bioactivity and chemical characteristics of humic acids from tropical soils sequence. **Soil Sci**. 173, 624–637. 2008.

CANELLAS, L.P., DANTAS, D.J., AGUIAR, N.O., PERES, L.E.P., ZSÖGÖN, A., OLIVARES, F.L., DOBBSS, L.B., FAÇANHA, A.R., NEBBIOSO, A., PICCOLO, A. Probing the hormonal activity of fractionated molecular humic components in tomato auxin mutants. **Ann. Appl. Biol**. 159, 202–211. 2011.

CANELLAS, L.P., DOBBS, L.B., OLIVEIRA, A.L., CHAGAS, J.G., AGUIAR, N.O., RUMJANEK, V.M., NOVOTNY, E.H., OLIVARES, F.L., SPACCINI, R., PICCOLO, A. Chemical properties of humic matter as related to induction of plant lateral roots. **Eur. J. Soil Sci.** 63,315–324. 2012.

CANELLAS, L.P., MARTÍNEZ-BALMORI, D., MÉDICI, L.O., AGUIAR, N.O., CAMPOSTRINI, E., ROSA, R.C., FACANHA, A., OLIVARES, F.L. A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). **Plant Soil** 366, 119–132. 2013.

CANELLAS, L.P., OLIVARES, F.L. Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. **Chem. Biol. Technol. Agric.** 1, 1–11. 2014.

CANELLAS, L.P., SILVA, S.F., OLK, D., OLIVARES, F.L. Foliar application of *Herbaspirillum seropedicae* and humic acid increase maize yields. **J. Food. Agric. Environ.** 13, 146–153. 2015.

CANELLAS, L.P., CANELLAS, N.O.A., DA S. IRINEU, L.E.S. et al. Plant chemical priming by humic acids. **Chem. Biol. Technol. Agric.** 7, 12 (2020). <https://doi.org/10.1186/s40538-020-00178-4>.

CASIERRA-POSADA, F.; PEÑA-OLMOS, J. E. Modificaciones fotomorfogénicas inducidas por la calidad de la luz en plantas cultivadas. **Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**, v. 39, p. 84-92, 2015.

CHAGAS, R. M. **Photosynthetic alterations and oxidative responses in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants treated with paraquat.** 2007. 82 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2007.

CHEN, Y., AVIAD, T., 1990. Effects of humic substances on plant growth. In: American Society of Agronomy, Soil Science Society of America (Eds.), Humic Substances in Soil and Crop Sciences, Selected Readings. **American Society of Agronomy**, Madison, pp. 161–186.

DINAKAR, C.; DJILIANOV, D.; BARTELS, D. Photosynthesis in desiccation tolerant plants: energy metabolism and antioxidative stress defense. **Plant Science**, v. 182, p. 29-41, 2012.

DUBEY, R. S. Metal toxicity, oxidative stress and antioxidative defense system in plants. In: GUPTA, S. D. (Ed.) Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. Enfield: **Science Publishers**, p.178-203. 2010.

DUTTA, B., LANGSTON, D.B., LUO, X., CARLSON, S., KICHLER, J.; GITAITIS, R. A risk assessment model for bacterial leaf spot of pepper (*Capsicum annuum*), caused by *Xanthomonas euvesicatoria*, based on concentrations of macronutrients, micronutrients, and micronutrient ratios. **Phytopathology**, 107, 1331–1338. 2017.

EDWARDS, C.A.; DOMINGUEZ, J.; ARANCON, N.Q. (2004) The influence of vermicomposts on plant growth and pest incidence. In: Shakir SH, Mikhail WZA (eds) **Soil**

zoology for sustainable development in the 21st century. Self-Publisher Cairo, Egypt, pp 397–420.

EDWARDS, C.A.; ARANCON, N.Q.; VASKO-BENNETT, M.; ASKAR, A.; KEENEY, G.; LITTLE, B. (2009). Suppression of green peach aphid (*Myzus persicae*) (Sulz.), citrus mealybug (*Planococcus citri*) (Risso), and two spotted spider mite (*Tetranychus urticae*) (Koch.) attacks on tomatoes and cucumbers by aqueous extracts from vermicomposts. **Crop Prot** 29:80–93. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2009.08.011>.

EMBRAPA/SEBRAE. Brazilian Vegetables Catalog: learn how to plant and use 50 of the most commercialized species in the country. Brasília: EMBRAPA. 2010. 59p. Available at: <http://www.sebrae.com.br/setor/horticultura>. Accessed on: 27 sep. 2021.

EYHERAGUIBEL, B.; SILVESTRE, J.; MORARD, P. (2008) Effects of humic substances derived from organic waste enhancement on the growth and mineral nutrition of maize. **Bioresource Technology**, 99:4206-4212.

FAÇANHA AR; FAÇANHA ALO; OLIVARES FL; GURIDI F; SANTOS GA; VELLOSO A C X.; R U M J A N E K V M.; B R A S I L F; SCHRIPEMA J; BRAZ-FILHO R; OLIVEIRA MA; CANELLAS LP. Humic acid bioactivity: effect on root development and plasma membrane proton pump. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 37: 1301-1310. 2002

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiologia plantarum**, v. 119, n. 3, p. 355–364, 2003.

GARCÍA, A. C., SANTOS, L. A., DE SOUZA, L. G. A., TAVARES, O. C. H., ZONTA, E., GOMES, E. T. M., et al. (2016). Vermicompost humic acids modulate the accumulation and metabolism of ROS in rice plants. **J. Plant Physiol.** 192, 56–63. doi: 10.1155/2016/3747501.

GARCÍA, A. C., SANTOS, L. A., IZQUIERDO, F. G., SPERANDIO, M. V. L., CASTRO, R. N.; BERBARA, R. L. L. (2012). Vermicompost humic acids as an ecological pathway to protect rice plant against oxidative stress. **Ecol. Eng.** 47, 203–208.

GARCÍA, A.C., SANTOS, L.A., IZQUIERDO, F.G., RUMJANEK, V.M., CASTRO, R.N., SANTOS, F.S., SOUZA, L.G.A., BERBARA, R.L.L. Potentialities of vermicompost humic acids to alleviate water stress in rice plants (*Oryza sativa* L.). **J. Geochem. Explor.** 136, 48–54. 2014.

GENTY, B.; BRIANTAIS, J.M.; BAKER, N. **Biochimica Biophysica Acta.** 990: 87. 1989.

GIOVANARDI, D.; DALLAI, D.; DONDINI, L.; MANTOVANI, V. Elicitation of resistance to bacterial canker of stone fruits by humic and fulvic acids (glucohumates): a cDNA-AFLP-dHPLC approach. **Scientia Horticulturae.** 212. 183–192. 10.1016/j.scienta.2016.09.048. 2016.

GUIMARÃES. T.G.; FONTES, P.C.R.; PEREIRA, P.R.G.; ALVAREZ V., V.H.; MONNERAT, P.H. Chlorophyll content determined by a portable meter and its relationship with nitrogen forms in tomato leaves grown in two types of soil. **Bragantia**, Piracicaba, v. 58, n. 1, p. 209-216, 1999.

HAMMERSCHMIDT R. **Systemic acquired resistance**. p. 173-222. In: Van Loon, L.C., ed. *Advances in botanical research*. Academic Press, New York, NY, USA JONES JDG, DANGL JL: The plant immune system. *Nature* 2006, 444:323-329. 2009.

HERNANDEZ, O.L., GARCIA, A.C., HUELVA, R., MARTÍNEZ-BALMORI, D., GURIDI, F., AGUIAR, N.O., OLIVARES, F.L., CANELLAS, L.P. Humic substances from vermicompost enhance urban lettuce production. **Agron. Sustain. Dev.** 35, 225–232. 2014.

IHSS - International Humic Substances Society (2014) Products. Available: <<http://www.ihss.gatech.edu/products.html>>. Accessed: 15 jul 2021.

INZÉ, D.; VAN MONTAGU, M. **Oxidative stress in plants**. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 6, n. 2, p. 153-158, 1995.

JANGRA, M.; SINDHU, S.; SONIKA, R.G.; BATRA, V.K. (2019) Studies on efficacy of vermicompost for the management of *Polyphagotarsonemus latus* (Banks) (Acari: Tarsonemidae) infesting chilli (*Capsicum annuum* L.) in Haryana. **Pharm Innovat J** 8:86–89

JANNIN, L.; ARKOUN, M., OURRY, A., LAÎNÉ, P., GOUX, D., GARNICA, M., FUENTES, M., FRANCISCO, S. S., BAIGORRI, R., CRUZ, F., HOUDUSSE, F., GARCIA-MINA, J.M., YVIN, J. C., ETIENNE, P. (2012) Microarray analysis of humic acid effects on *Brassica napus* growth: Involvement of N, C and S metabolisms. **Plant Soil**, 359:297-319.

JINDO, K., OLIVARES, F. L., MALCHER, D., SÁNCHEZ-MONEDERO, M. A., KEMPENAAR, C., & CANELLAS, L. P. From Lab to Field: Role of Humic Substances Under Open-Field and Greenhouse Conditions as Biostimulant and Biocontrol Agent. **Frontiers in plant science**, 11, 426. 2020.

JOSHI, R., SINGH, J., & VIG, A. P. (2014). Vermicompost as an effective organic fertilizer and biocontrol agent: effect on growth, yield and quality of plants. **Reviews in Environmental Science and BioTechnology**, 14(1), 137–159. Doi:10.1007/s11157-014-9347-1.

KRAUS, T.E. et al. Paclobutrazol-induced tolerance of wheat leaves to paraquat may involve increased antioxidant enzyme activity. **Journal of Plant Physiology**, 145, 570-576, 1995.

KRAUSE, G.; WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 42, n. 1, p. 313-349, 1991.

LIMA, A. A.; AVARENGA, M. A. R.; RODRIGUES, L.; CARVALHO, J. G. Leaf nutrient concentration and yield of tomato grown under different substrates and doses of humic acids. **Horticultura Brasileira**, Brasília DF, v. 29, n. 1, p. 63-69, 2011.

LICHTENTHALER, H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigment photosynthetic biomembranes. **Methods Enzymol.**, San Diego, v.148, p. 362-385. 1987.

MACHADO, W.; FRANCHINI, J. C.; GUIMARÃES, M. F.; FILHO, J. T. Spectroscopic characterization of humic and fulvic acids in soil aggregates, Brazil. **Helyon**. 2020.

MANANDHAR, T.; YAMI, K. D. (2008) Biological control of foot rot disease of rice using fermented products of compost and vermicompost. **Sci World** 6:52–57.

MADEJON, E., LOPEZ, R., MURILLO, J.M., CABRER, A.F. Agricultural use of three (sugar-beet) vinasse composts: effect on crops and chemical properties of a Cambisol soil in the Guadalquivir river valley (SW Spain). **Agric. Ecosyst. Environ.** 84, 55–65. 2001

MAREK, J. **Physiological and metabolic effects on tomato by strobilurins and carboxamides**. Thesis (Doctorate) - State University of the Midwest, Postgraduate Program in Agronomy, Concentration area in Vegetal Production. Guarapuava, 2018.

MARKWELL, J.; OSTERMAN, J.C.; MITCHELL, J.L. Calibration of the Minolta SPAD-502 leaf chlorophyll meter. **Photosynthesis Research**, v. 46, p. 467-472, 1995.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002.

MOLDES, C.A.; MEDICI, L.O.; ABRAHÃO, O.S.; TSAI, S.M.; AZEVEDO, R.A. Biochemical responses of glyphosate resistant and susceptible soybean plants exposed to glyphosate. **Acta Physiol Plant**, 30, 469-479, 2008.

MORINIÈRE, L., BURLET, A., ROSENTHAL, E.R., NESME, X., PORTIER, P., BULL, C.T. (2020) Clarifying the taxonomy of the causal agent of bacterial leaf spot of lettuce through a polyphasic approach reveals that *Xanthomonas cynarae* Trébaol et al. 2000 emend. Timilsina et al. 2019 is a later heterotypic synonym of *Xanthomonas hortorum* Vauterin et al. 1995. **Systematic and Applied Microbiology**, 43, 126087.

MORA, V.; BACAICOA, V.; ZAMARREÑO, A. M.; AGUIRRE, E.; GARNICA, M.; FUENTES, M.; GARCÍA-MINA, J. M. (2010) Action of humic acid on promotion of cucumber shoot growth involves nitrate related changes associated with the root-to-shoot distribution of cytokinins, polyamines and mineral nutrients. **Journal of Plant Physiology**, 167:633-642.

MORA, V.; BAIGORRI, R.; BACAICOA, E.; ZAMARREÑO, A. M.; GARCÍA-MINA, J.M. (2012) The humic acid-induced changes in the root concentration of nitric oxide, IAA and ethylene do not explain the changes in root architecture caused by humic acid in cucumber. **Environmental and Experimental Botany**, 76:24-32.

MUNROE, G. (2007) **Manual of on-farm vermicomposting and vermiculture**. Publication of Organic Agriculture Centre of Canada, Nova Scotia.

MUR, L. A. J.; SIMPSON, C.; KUMARI, A.; GUPTA, A. K.; GUPTA, K. J. 2016. Moving nitrogen to the centre of plant defence against pathogens. Review: part of a special issue on plant immunity. **Annals of Botany** 119: 703–709, 2016 doi:10.1093/aob/mcw179.

MUSCOLO, A.; SIDARI, M.; NARDI, S. (2013) Humic substance: relationship between structure and activity. Deeper information suggests univocal findings. **Journal of Geochemical Exploration**, 129:57-63.

NAKASONE, A. K., BETTIOL, W.; DE SOUZA, R. M. (1999) The effect of water extracts of organic matter on plant pathogens. **Summa Phytopathol** 25:330–335.

NANNIPIERI, P.; MUCCINI, L.; CIARDI, C. (1983) Microbial biomass and enzyme activities: production and persistence. **Soil Biology and Biochemistry**, 15:679-685.

NARDI, S.; SCHIAVON, M.; FRANCIOSO, O. Chemical Structure and Biological Activity of Humic Substances Define Their Role as Plant Growth Promoters. **Molecules** 26, 2256. 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26082256>.

NEBBIOSO, A., PICCOLO, A. Basis of a humeomics science: chemical fractionation and molecular characterization of humic biosuprastructures. **Biomacromolecules** 12, 1187–1199. 2011.

NEBBIOSO, A., PICCOLO, A. Advances in humeomic: enhanced structural identification of humic molecules after size fractionation of a soil humic acid. **Anal. Chim. Acta** 720, 77–90. 2012.

NEBBIOSO, A., VINCI, G., DROSOS, M., SPACCINI, R., PICCOLO, A. Unveiling themolecular composition of the unextractable soil organic fraction (humin) byhumeomics. **Biol. Fertil. Soils**, 2015.

OLIVEIRA, M. D. M.; VARANDA, C. M. R.; FÉLIX, M. R. F. Induced resistance during the interaction pathogen x plant and the use of resistance inducers. **Phytochemistry letters**, v. 15, p. 152-158, 2016.

PICCOLO, A., The supramolecular structure of humic substances. A novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. **Adv.Agron.** 75, 57–134. 2002.

PICCOLO, A. The nature of sol organic matter and innovative soil management to fight global changes and maintain agricultural productivity. In: Piccolo, A.(Ed.), Carbon Sequestration in Agricultural Soils: a Multidisciplinary Approach to Innovative Methods. **Springer, Heidelberg**, pp. 1–20. 2012

PICCOLO, A., CONTE, P., COZZOLINO, A. Effects of mineral and monocarboxylic acids on the molecular association of dissolved humic substances. **Eur. J. Soil Sci.** 50, 687–694. 1999.

PICCOLO, A., CONTE, P., SPACCINI, R., CHIARELLA, M. Effects of some dicarboxylic acids on the association of dissolved humic substances. **Biol. Fertil. Soils** 37,255–259. 2003.

PICCOLO, A., NARDI, S., CONCHERI, G. Structural characteristics of humic substances as related to nitrate uptake and growth regulation in plant systems. **Soil Biol. Biochem.** 24, 373–380. 1992.

PINTON, R., CESCO, S., IACOLETTIG, G., ASTOLFI, S., VARANINI, Z. Modulation of NO₃-uptake by water-extractable humic substances: involvement of root plasma membrane H⁺-ATPase. **Plant Soil** 215, 155–161. 1999.

PIZZEGHELLO, D., NICOLINI, G., NARDI, S. Hormone-like activity of humic substances in *Fagus sylvatica* forests. **New Phytol.** 151, 647–657. 2001.

PUGLISI, E., FRAGOULIS, G., DEL RE, A.A., SPACCINI, R., PICCOLO, A., GIGLIOTTI, G., SAID-PULLICINO, D., TREVISAN, M. 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** 73,1292–1299. 2008.

RAVINDRAN, B.; LEE, S.R.; CHANG, S.W.; NGUYEN, D.D.; CHUNG, W.J.; BALASUBRAMANIAN, B.; MUPAMBWA, H.A.; ARASU, M.V.; AL-DHABI, N.A.; SEKARAN, G. (2019). Positive effects of compost and vermicompost produced from tannery waste-animal fleshing on the growth and yield of commercial crop-tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) plant. **J Environ Manag** 234:154–158. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.12.100>

RODRIGUES, C. R.; RODRIGUES, T. M.; LUZ, J. M. Q.; SOUSA, V. B. F.; SOUSA, J. B.; NUNES, A. C. P.; TRINDADE, P. R. Chlorophyll a and b of tomato plants treated with potassium silicate and fungicide. **Global Science and Technology**, v. 9, n. 2, p. 54-64, 2016.

SHAH, Z. H.; REHMAN, H. M; AKHTAR, T.; ALSAMADANY, H.; HAMOOH, B. T.; MUJTABA, T.; DAUR, I.; AL Zahrani, Y.; ALZahrani, H. A. S.; ALI, S.; YANG, S. H.; CHUNG, G. (2018) Humic Substances: Determining Potential Molecular Regulatory Processes in Plants. **Front. Plant Sci.** 9:263. doi: 10.3389/fpls.2018.00263.

SCANDALIOS J. G.; ACEVEDO A.; RUZSA S. Catalase gene expression in response to chronic high temperature stress in maize. **Plant Science**, v. 156, n. 1, p. 103-110, 2000.

SCHIAVON, M., PIZZEGHELLO, D., MUSCOLO, A., VACCARO, S., FRANCIOSO, O., NARDI, S. High molecular size humic substances enhance phenylpropanoid metabolism in maize (*Zea mays* L.). **J. Chem. Ecol.** 36, 662–669. 2010.

SCHREIBER, U. **Photosynthesis Research.** 9: 261. 1986.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). **Interação Planta Patógeno: Fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular.** Piracicaba: FEALQ, 2008. p.227-248.

SCHUELTER, A. R.; FINGER, F. L; CASALI, V. W. D.; AMARAL, D. S. S. L; SHIMOYA, A. Evaluation of chlorophyll levels in tomato leaves of the cultivar Santa Clara, the mutant 'firm' and the hybrid F1. **Acta Scientiarum: Biological Sciences.** v. 25, n. 1, p. 183-187, 2003.

SENESI, N.; PLAZA, C.; BRUNETTI, G.; POLO, A. (2007) A comparative survey of recent results on humic-like fractions in organic amendments and effects on native soil humic substances. **Soil Biol Biochem** 39(6):1244–1262.

SILVA, R. M.; JABLONSKI, A.; SIEWERDT, L.; SILVEIRA JÚNIOR, P. Root development of ryegrass cultivated in complete nutrient solution, added with humic

substances, under greenhouse conditions. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 29:1623-1631. 2008.

SIMSEK-ERSAHIN, Y.; HAKTANIR, K.; YANAR, Y. (2009) Vermicompost from agricultural wastes suppress *Rhizoctonia solani* Kuhn in cucumber seedlings. **J Plant Dis Prot** 116:182–188.

SIMSEK-ERSAHIN, Y. ECE, A. KARNEZ, E. Differential Effects of a Vermicompost Fertilizer on Emergence and Seedling Growth of Tomato Plants. **Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology** 5(11):1360. 2014.

SZCZECH, M. M. (1999) Suppressiveness of vermicompost against Fusarium wilt of tomato. **J Phytopathol** 147:155–161.

SZCZECH, M. M., SMOLINSKA, U. (2001) Comparison of suppressiveness of vermicomposts produced from animal manures and sewage sludge against *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan var. *nicotianae*. **J Phytopathol** 149:77–82.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 5. ed., Artmed 918, p. 2013.

TEJADA, M.; GONZALEZ, J. L. (2003) Effects of foliar application of a byproduct of the two-step olive oil mill process on maize yield. **Agronomie**, 23:617-623.

TREVISAN, S., FRANCIOSO, O., QUAGGIOTTI, S., NARDI, S. Humic substances biological activity at the plant–soil interface: from environmental aspects to molecular factors. **Plant Signal. Behav.** 5 (6), 635–643. 2010 a.

TREVISAN, S., PIZZEGHELLO, D., RUPERTI, B., FRANCIOSO, O., SASSI, A., PALME, K., NARDI, S. Humic substances induce lateral root formation and expression of the early auxin-responsive IAA19 gene and DR5 synthetic element in Arabidopsis. **Plant Biol.** 12, 604–614. 2010b.

TKALEC M, VINKOVIĆ T, BALIČEVIĆ R, PARAĐIKOVIĆ N. Influence of biostimulants on growth and development of bell pepper (*Capsicum annuum* L.). **Acta Agric Serb.** 29:83–88. 2010.

VALE, F.X.R.; FERNANDES FILHO, E.I.; LIBERATO, J.R. **A software plant disease severity assessment**. In: International Congress of Plant Pathology, 8., 2003, Christchurch. Anais. Christchurch: New Zealand, 2003. p.105 (Resumo).

VARANINI, Z., PINTON, R. Humic substances and plant nutrition. **Prog. Bot.** 56, 97–117. 1995.

WAGNER, G. H., and WOLF, D. C. **Carbon transformations and soil organic matter formation**. In “Principles and Applications of Soil Microbiology” (D. M. Sylvia, J. J. Fuhrmann, P. G. Hartel, and D. A. Zuberer). Prentice-Hall, upper Saddle River, NJ, pp. 259-294. 1998.

WALZ. **Portable chlorophyll fluorometer PAM-2000 and data acquisition software DA-2000**. Effeltrich: Walz Mess-und Regeltechnik, 199p. 1993.

YATOO, A. M.; NIAMAT, ALI.; ZAHOOR, A. B.; HASSAN, B. Sustainable management of diseases and pests in crops by vermicompost and vermicompost tea. A review. **Agronomy for Sustainable Development** 41: 7. 2021.

YEOM, M.; KIM, H.; LIM, J.; SHIN, A. Y.; HONG, S.; KIM, J.; NAM, H. G. How do phytochromes transmit the light quality information to the circadian clock in Arabidopsis. **Molecular Plant**, v. 7, n. 11, p. 1701-1704, 2014.

YILDIRIM, E. Foliar and soil fertilization of humic acid affect productivity and quality of tomato. **Acta Agriculturae Scandinavica**, v.57, p.182-186, 2007.

ZALLER, J. G. (2006) Foliar spraying of vermicompost extracts: effect on food quality and indications of late blight suppression of field-grown tomatoes. **Biol Agric Hortic** 24:165–180. Doi: 10.1080/01448765.2006.9755017

6 CONCLUSÕES GERAIS

Os estudos sobre o controle alternativo de doenças em plantas são essenciais para o futuro da agricultura ecológica e sustentável, através da prospecção e viabilização do uso de novos produtos naturais, visando uma produção de alimentos mais saudáveis ao alcance de todos. Os polissacarídeos da babosa, o hidrolato de melaleuca e o vermicomposto líquido, quando aplicados por pulverização foliar, controlam a mancha bacteriana em tomateiros, além de promoverem o crescimento, alterarem as atividades de enzimas antioxidantes e induzirem a resistência das plantas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBIACH, R., CANET, R., POMARES, F., INGELMO, F. Organic matter components, aggregate stability and biological activity in a horticultural soil fertilized with different rates of two sewage sludges during ten years. **Bioresour. Technol.** 77, 109–114. 2001.

ARANCON, N.Q., EDWARDS, C.A., BIERMAN, P., WELCH, C., METZGER, J.D. Influences of vermicomposts on field strawberries: 1. Effects on growth and yields. **Bioresour. Technol.** 93, 145–153. 2004.

ARANCON, N.Q.; EDWARDS, C.A. **Vermicomposts can suppress plant pest and disease attacks.** Biocycle. 2004

BESTFLEISCH M, MÖHRING J, HANKE M-V, PEIL A, FLACHOWSKY H, 2012. Resistance and systemic dispersal of *Xanthomonas fragariae* in strawberry germplasm (*Fragaria L.*). **Plant Breeding** 133, 115– 20.

CHEN, Y., AVIAD, T. Effects of humic substances on plant growth. In: American Society of Agronomy, Soil Science Society of America (Eds.), Humic Substances in Soil and Crop Sciences, Selected Readings. **American Society of Agronomy**, Madison, pp. 161–186. 1990.

COSTA, J. R. et al. Ocorrência e caracterização do complexo de espécies causadoras da mancha bacteriana do tomateiro no Alto Vale do Rio do Peixe, SC. **Trop. plant pathol.**, Brasília, v. 37, n. 2, p. 149-154, Apr. 2012.

BULGARI R, COCETTA G, TRIVELLINI A, VERNIERI P, FERRANTE A. Biostimulants and crop responses: a review. **Biol Agric Hortic.** 31:1–17. 2015. doi: 10.1080/01448765.2014.964649

DE CARVALHO, J. A.; VIOL, A, M. A; DE CASTRO LIMA, E. M.; Déficit hídrico e produção do tomate cultivado em ambiente protegido. Ver. Bras. Agricult. Irrigada – RBAI. jan/fev2017, Vol. 11 Issue 1, p1244-1253. 10p. 2017.

EMBRAPA/SEBRAE. Catálogo Brasileiro De Hortaliças: saiba como plantar e aproveitar 50 das espécies mais comercializadas no País. Brasília: EMBRAPA. 2010. 59p. Disponível em: <http://www.sebrae.com.br/setor/horticultura>. Acesso em: 27 set. 2021.

FRACCHIA, L.; DOHRMANN, A. B.; MARTINOTTI, M. G.; TEBBE, C. C. Bacterial diversity in a finished compost and vermicompost: differences revealed by cultivation-independent analyses of PCR-amplified 16S rRNA genes. **Appl Microbiol Biotechnol** 71:942–952. 2006. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0228-y>

FRITSCHÉ-NETO R, BORÉM A. **Melhoramento de plantas para condições de estresses bióticos**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 240p. 2012.

HAMMERSCHMIDT R. Systemic acquired resistance. p. 173-222. In: Van Loon, L.C., ed. *Advances in botanical research*. Academic Press, New York, NY, USA JONES JDG, DANGL JL: The plant immune system. **Nature** 2006, 444:323-329. 2009.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. LSPA - Levantamento sistemático da produção agrícola: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. AGROPECUÁRIA, D. D. P. C. D. Rio de Janeiro, p.25-130, 2018.

LUIZ, C., FELIPINI, R.B., COSTA, M.E.B., DI PIERO, R.M. Polysaccharides from *Aloe barbadensis* reduce the severity of bacterial spot and activate disease-related proteins in tomato. **Journal of Plant Pathology** 94: 387-393. 2012.

LUIZ, C.; NETO, A. C. R.; FRANCO, P. O.; DI PIERO, R. M. Emulsions of essential oils and aloe polysaccharides: Antimicrobial activity and resistance inducer potential against *Xanthomonas fragariae*. **Trop. plant pathology**. 2017.

MADEJON, E., LOPEZ, R., MURILLO, J.M., CABRER, A.F. Agricultural use of three (sugar-beet) vinasse composts: effect on crops and chemical properties of a Cambisol soil in the Guadalquivir river valley (SW Spain). **Agric. Ecosyst. Environ.** 84, 55–65. 2001.

NEBBIOSO, A., PICCOLO, A. Basis of a humeomics science: chemical fractionation and molecular characterization of humic biosuprastructures. **Biomacromolecules** 12, 1187–1199. 2011.

NEBBIOSO, A., PICCOLO, A. Advances in humeomic: enhanced structural identification of humic molecules after size fractionation of a soil humic acid. **Anal. Chim. Acta** 720, 77–90. 2012.

NEBBIOSO, A., VINCI, G., DROSOS, M., SPACCINI, R., PICCOLO, A. Unveiling themolecular composition of the unextractable soil organic fraction (humin) byhumeomics. **Biol. Fertil. Soils**, 2015.

OLIVARES, F. L., AGUIAR, O. N., ROSA, R. C. C., CANELLAS, L. P. Substrate biofortification in combination with foliar sprays of plant growth promoting bacteria and humic substances boosts production of organic tomatoes. **Sci. Hortic.** 183, 100–108. 2015. doi: 10.1016/j.scienta.2014.11.012

ORDÓÑEZ-SANTOS, L. E. VÁZQUEZ-ODÉRIZ, L.; ARBONES-MACIÑEIRA, E.; ROMERO-RODRÍGUEZ, M. A. The influence of storage time on micronutrients in bottled tomato pulp. **Food Chemistry**, v.112, p.146–149, 2009.

PICCOLO, A., The supramolecular structure of humic substances. A novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. **Adv.Agron.** 75, 57–134. 2002.

PIMENTEL, A. J. C.; MAGALHÃES, E. C. P. MAGALHÃES, P. M. **Defesa e nutrição de plantas com hidrolato e biomassa resultante da destilação de óleos essenciais.** 10º Simpósio Brasileiro de óleos essenciais (Resumo). Brasília, DF. 2019.

SCHIAVON, M., PIZZEGHELLO, D., MUSCOLO, A., VACCARO, S., FRANCIOSO, O., NARDI, S. High molecular size humic substances enhance phenylpropanoid metabolism in maize (*Zea mays* L.). **J. Chem. Ecol.** 36, 662–669. 2010.

SILVA, R. M.; JABLONSKI, A.; SIEWERDT, L.; SILVEIRA JÚNIOR, P. Root development of ryegrass cultivated in complete nutrient solution, added with humic substances, under greenhouse conditions. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 29:1623-1631. 2008.

SIMSEK-ERSAHIN, Y. ECE, A. KARNEZ, E. Differential Effects of a Vermicompost Fertilizer on Emergence and Seedling Growth of Tomato Plants. **Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology** 5(11):1360. 2014.

STADNIK, M. J.; MARASCHIN, M. Indução de resistência de plantas a fitopatógenos. In: STADNIK, M. J.; TALAMINI, V. **Manejo Ecológico de Doenças de Plantas.** Florianópolis: CCA/UFSC, 2004. v. 1, 293 p.

STICHER, L.B.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J.P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Lawrence, v. 35, p. 235- 270, 1997.

TKALEC M, VINKOVIĆ T, BALIČEVIĆ R, PARADIKOVIĆ N. Influence of biostimulants on growth and development of bell pepper (*Capsicum annuum* L.). **Acta Agric Serb.** 29:83–88. 2010.

VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v. 36, p. 453-483, 1998.

VARANINI, Z., PINTON, R. Humic substances and plant nutrition. **Prog. Bot.** 56, 97–117. 1995.

VIEIRA E. L.; CASTRO. P.R.C. Ação do Stimulate na germinação de sementes, vigor de plântulas e crescimento radicular de plantas de milho (*Zea mays* L.). Piracicaba: ESALQ/USP, 2001.