

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOLOGIA
MESTRADO DE MESTRADO EM AGROECOLOGIA

JOSÉ RIBAMAR MUNIZ CAMPOS NETO

**INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA NO MANEJO DA FUSARIOSE DO
TOMATEIRO EM SÃO LUÍS-MA**

São Luís – MA

2013

JOSÉ RIBAMAR MUNIZ CAMPOS NETO

Engenheiro Agrônomo

**INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA NO MANEJO DA FUSARIOSE DO
TOMATEIRO EM SÃO LUÍS-MA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agroecologia da Universidade Estadual do Maranhão, como parte dos requisitos para obtenção de título de Mestre em Agroecologia.

Orientadora: Profa. Dra. Antônia Alice Costa Rodrigues

São Luís – MA

2013

JOSÉ RIBAMAR MUNIZ CAMPOS NETO

**INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA NO MANEJO DA FUSARIOSE DO
TOMATEIRO EM SÃO LUÍS-MA**

Aprovado em 22 de julho de 2013

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Antônia Alice Costa Rodrigues (Orientadora)

Universidade Estadual do Maranhão - UEMA

Prof.^a Dr. Fávio Henrique Reis Moraes (1º examinador)

Centro de Ensino Universitário do Maranhão - CEUMA

Prof.^o Dr. Cláudio Belmino Maia (2º examinador)

Universidade Estadual do Maranhão - UEMA

Dedico

Aos meus pais,
Mauro Luís Bayma do Lago Araújo,
por uma vida de dedicação e amor incondicional aos filhos,
e Cláudia Lúcia Moreira Campos,
pelo incentivo, carinho e compreensão.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por sempre iluminar minha vida, direcionar meus passos e acreditar no meu Eu.

À **Universidade Estadual do Maranhão**, por meio da Coordenação do Programa de Pós-graduação em Agroecologia, pelas oportunidades, experiências e apoio.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Maranhão** – FAPEMA, que financiou este projeto de pesquisa, tornou essa pesquisa possível.

À Embrapa hortaliças, por ceder o isolado “Fol 88” de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* utilizado nesse trabalho.

À minha orientadora, Professora Dra. **Antônia Alice Costa Rodrigues**, pela orientação, pelo incentivo e dedicação. Por acreditar na minha capacidade e participar na formação do meu caráter.

À Professora Msc. **Ivaneide de Oliveira Nascimento**, à Msc. **Janaína Marques Mondego** e ao Engenheiro Agrônomo **Leonardo Goes de Oliveira**, pelo apoio imprescindível e troca de conhecimentos.

Aos **meus pais**, pelo constante incentivo e incondicional amor ministrado.

Em especial à minha namorada **Laiana Maria Pinto Linhares** que, mesmo distante, mostrou-se tão presente nos momentos mais difíceis.

Aos meus colegas e amigos do **Laboratório de Fitopatologia da UEMA**, pela ajuda, companheirismo e pelos momentos de alegria compartilhados. Muito mais que uma equipe, uma verdadeira família.

À minha grande amiga **Nathália Bandeira Diniz**, pela amizade e companheirismo, auxiliando na realização do trabalho.

À toda minha família e amigos, que sempre acreditaram no meu potencial, incentivando e dando forças nos momentos difíceis.

A todos os colegas e amigos do Mestrado em Agroecologia da Universidade Estadual do Maranhão, reforçando que tais laços dão sustentação e incentivo na realização das atividades.

Utopía

“[...] ella está en el horizonte.

Me acerco dos pasos, ella se aleja dos pasos.

Camino diez pasos y el horizonte se corre diez pasos más allá.

Por mucho que yo camine, nunca la alcanzaré.

Para que sirve la utopía? Para eso sirve: para caminhar!”

Fernando Birri apud Eduardo Galeano

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	ix
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
CAPÍTULO 1 – REFERENCIAL TEÓRICO	14
O Hospedeiro: Tomate	15
O Patógeno: <i>Fusarium</i>	17
Descrição da Doença: Fusariose do Tomateiro	18
Estratégias de Manejo de Doenças	20
Indução de Resistência.....	21
Mecanismos Bioquímicos Envolvidos na Indução de Resistência.....	25
REFERÊNCIAS	28
CAPÍTULO 2 – EFFECTS OF ABIOTIC COMPOUNDS AS INDUCERS OF RESISTANCE TO FUSARIUM WILT IN TOMATOES.....	37
ABSTRACT	39
RESUMO	40
INTRODUCTION.....	41
MATERIALS AND METHODS	43
Experimental location and procurement of the <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> isolate	43
Effect of abiotic products <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> on mycelial growth and sporulation in vitro.....	43
Use of inductors in Fusarium wilt control in tomatoes.....	44
Evaluation of biochemical compounds involved in the induction process	45
Total protein extraction	45
Peroxidase activity (E.C. 1.11.1.7)	46
Polyphenol oxidase activity (E.C. 1.10.3.1).....	46
β -1,3-glucanase activity (E.C. 3.2.1.29).....	47
Determination of soluble proteins.....	48
RESULTS.....	48

Effect of abiotic products <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> on mycelial growth and sporulation in vitro	48
Use of inductors in Fusarium wilt control in tomatoes	50
Evaluation of biochemical compounds involved in the induction process	50
Peroxidase activity (E.C. 1.11.1.7)	50
Polyphenol oxidase activity (E.C. 1.10.3.1).....	50
β -1,3-glucanase activity (E.C. 3.2.1.29).....	51
DISCUSSION	51
ACKNOWLEDGMENTS	58
REFERENCES	59
CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
ANEXO	75
NORMAS DA REVISTA TROPICAL PLANT PATHOLOGY	76

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 01:** *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* mycelial growth as a function of the nature and concentration of the inducer over a 10-day evaluation period..... 67
- Figura 02:** Linear correlation between inducer concentration and *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* mycelial growth. 68
- Figura 03:** Linear correlation between inducer concentration and *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* sporulation 69
- Figura 04:** Hydrogen peroxide oxidation by the peroxidase enzyme in response to different resistance inducers that were applied to tomato plants..... 70
- Figura 05:** Abiotic product-induced polyphenol oxidase activity in tomato leaves 71
- Figura 06:** Abiotic product-induced β -1,3-glucanase activity in tomato leaves 72

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Evaluation of <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> mycelial growth inhibition in response to abiotic product application.....	62
Tabela 02: Evaluation of the inhibition of <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> sporulation in response to abiotic product application.....	64
Tabela 03: “ <i>In vivo</i> ” <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> control in response to abiotic product application	66

INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA NO MANEJO DA FUSARIOSE DO TOMATEIRO EM SÃO LUÍS-MA

Autor: José Ribamar Muniz Campos Neto
Orientador: Antônia Alice Costa Rodrigues

RESUMO – O tomateiro (*Solanum lycopersicon* L.) é afetado por diversas doenças fúngicas dentre elas a murcha de fusário causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Snyder & Hansen. No Maranhão, o agricultor familiar utiliza de forma inadequada grande quantidade de agroquímicos no controle de fitopatógenos, principalmente na cultura o tomateiro, resultando em impactos ambientais e sociais na área produtora do Estado, necessitando-se de uma inversão desse quadro. É crescente o interesse por meios viáveis e eficientes no controle de fitopatógenos e os indutores de resistência têm mostrado resultados eficientes e promissores. Com o objetivo de estudar a indução de resistência como controle da fusariose do tomateiro utilizou-se os produtos comerciais ASM, Agro-Mos, Quitosana, Biopiról e óleo de Nim sobre crescimento micelial e esporulação de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* e na indução de resistência do tomateiro à fusariose, através da expressão de atividade de enzimas relacionadas ao processo indutivo, tais como: peroxidase, polifenoloxidase e β -1,3-glucanase. Para a avaliação do crescimento micelial e esporulação, adicionou-se diferentes concentrações dos produtos em meio de cultura Batata-Dextrose-Agar (BDA), efetuando-se a repicagem do patógeno, cuja avaliação ocorreu após 10 dias. O experimento “*in vivo*” foi implantado em casa de vegetação. Pulverizou-se os produtos no primeiro par de folhas até o ponto de escorrimento em plantas de tomateiro da variedade Santa Cruz, com 25 dias de idade.. A inoculação do patógeno ocorreu cinco dias após a indução na concentração de 1×10^6 conídios/ml. Avaliou-se a severidade da doença com base em escala de notas. A atividade enzimática foi determinada seguindo de protocolo específico para cada enzima. Os resultados demonstram que o óleo de Nim controlou o crescimento micelial e esporulação do patógeno, enquanto que o ASM influenciou na esporulação. Foi verificada a redução da severidade da Fusariose do tomateiro. Dentre os produtos, destacaram-se o óleo de Nim, Agro-Mos e Biopiról pela expressão significativa de Peroxidase, Polifenoloxidase e β -1,3-glucanase, respectivamente.

Palavras-chave: *Solanum lycopersicum* L., indutores abióticos, atividade enzimática.

INDUCTION OF RESISTANCE IN THE CONTROL OF FUSARIUM WILT OF TOMATO IN SÃO LUIS-MA

Author: José Ribamar Muniz Campos Neto

Advisor: Antônia Alice Costa Rodrigues

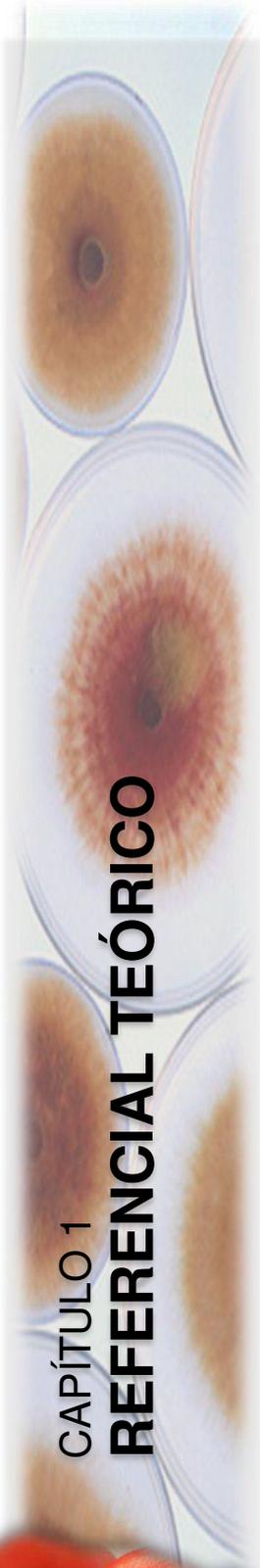
ABSTRACT – The tomato (*Solanum lycopersicon* L.) has its origin in the Andean area of South America and belongs to the Solanaceae family. This culture is affected by various fungal diseases among them the Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Snyder & Hansen. In Maranhão, the family farmer uses wrongly a lot of chemicals to control plant pathogens in the culture tomato. Been occurring environmental and social impacts throughout the state. A growing interest in alternative viable and efficient control of pathogens and the resistance inducers have shown promising results and efficient. In order to study the induction of resistance to fusarium wilt of tomato control we used commercial products ASM, Agro-Mos, Chitosan, Biopirrol and neem oil on mycelial growth and sporulation of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* and induced resistance of tomato to Fusarium, through the expression of enzyme activity related to the inductive process: peroxidase, polyphenol oxidase and β -1,3-glucanase. Was added different concentrations of the products in the culture medium Potato Dextrose Agar (PDA), making up the inoculation of the pathogen and evaluation of mycelial growth and sporulation after 10 days of evaluation. The experiment "in vivo" took place in the greenhouse. the products were powdered on the first pair of leaves, into the point of runoff, in Santa Cruz variety of plants grown 25 days on soil autoclaved. The inoculation of the pathogen occurred after five days at a concentration of 106 conidia / ml. We evaluated the severity of the disease based on rating scale. The enzyme activity was determined using a specific protocol for each enzyme. The results demonstrate that neem oil controlled mycelial growth and sporulation of the pathogen, whereas the ASM had influence only on sporulation. Decrease of severity of tomato Fusarium. Highlight the Neem oil, Agro-Mos and Biopirrol by significant expression of Peroxidase, Polyphenoloxidase and β -1,3-glucanase, respectively.

Key words: *Solanum lycopersicum* L., abiotic inducers, enzymatic activity



CAPÍTULO 1

REFERENCIAL TEÓRICO



CAPÍTULO 1 – REFERENCIAL TEÓRICO

O Brasil é um dos principais produtores de tomate, com uma produção superior a 4,4 milhões de toneladas. O Nordeste destaca-se como a terceira região produtora deste fruto, produzindo 622.215 toneladas, sendo o Estado do Maranhão o sexto em produção, com pouco mais de 4.739 toneladas em 228 hectares de área plantada (IBGE, 2011).

Embora se reconheça o potencial da tomaticultura, sabe-se que esta cultura está sujeita à ocorrência de várias doenças influenciadas, por exemplo, pelo clima, tipo da cultivar plantada, qualidade da semente, tipo de solo, manejo da cultura, dentre outros, que, somados à escassez de medidas eficientes de controle de patógenos, podem inviabilizar a produção.

Entre as doenças de importância econômica que afetam o tomateiro destaca-se a Fusariose do tomateiro causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *lycopersici* Snyder; Hansen (KUROSAWA; PAVAN, 1997).

A deficiência no controle desta doença, associada às condições ambientais favoráveis ao fungo, inviabilizam economicamente o cultivo do tomate no Estado do Maranhão. Tal situação eleva o custo da produção, diminui a acessibilidade da população e exige a importação desta hortaliça de outros Estados, acarretando prejuízos para o produtor local e ônus ao consumidor, o que reflete de forma negativa na cadeia produtiva.

O uso de cultivares resistente constitui o método mais eficiente de controle desta doença, contudo existem algumas limitações como o nível de resistência parcial e quase sempre não está disponível aos produtores, principalmente no estado do Maranhão. Em face de indisponibilidade de cultivares de tomateiro com resistência a Fusariose do tomateiro e, em alguns casos, a necessidade do uso de cultivares suscetíveis mais produtivas, métodos de controle alternativos devem ser pesquisados.

As medidas de controle da doença, sejam culturais ou que tenham como base o uso de produtos químicos, são pouco efetivas e com elevados custos, acarretando ônus na produção (JONES; WOLTZ, 1981). O uso de agroquímicos causa danos irreversíveis ao meio ambiente e à saúde do homem. Sistemas de produção alternativos ou não convencionais podem ser importantes em reduzir os impactos ambientais e sociais causados pelo atual modelo de produção agrícola. Com a introdução desses sistemas, reduzem-se os riscos de poluição e de intoxicação de operadores, consumidores e meio ambiente.

Nesse contexto, a resistência sistêmica adquirida (RSA) pode ser uma alternativa viável no controle da Fusariose do tomateiro a RSA resulta da ativação do sistema de defesa da planta, por elicitores bióticos e/ou abióticos, com a indução e expressão de mecanismos

relacionados com a produção de substâncias tóxicas ao patógeno e/ou formação de barreiras estruturais que restringem a colonização dos tecidos (KUC, 2001).

O uso de indutores de resistência no controle de doenças de plantas tem apresentado sucesso em espécies arbóreas como *Eucalyptus marginata*, e é indicado no controle de oomicetos como *Phytium* spp. e *Phytophthora* spp. e de fungos causadores de podridão do colo, raiz, tronco e frutos (MCDONALD et al., 2001). O efeito direto do indutor de resistência no metabolismo de *Phytophthora* é importante na supressão dessa doença, mas não deve ser o único mecanismo de ação desses compostos, pois eles podem atuar também, na ativação do sistema de defesa natural da planta (JACKSON et al., 2000).

Vários trabalhos mostraram a eficiência do acibenzolar-S-metil (ASM) e ácido α -aminobutírico (BABA) induzindo proteção contra diferentes patógenos através da ativação da RSA (COHEN et al., 1999; JEUN; BUCHENAUER, 2001).

A Quitosana é outro indutor de resistência que vêm sendo avaliado na agricultura, obtida a partir da reação de desacetilação parcial da quitina presente em invertebrados marinhos, insetos, fungos e leveduras (MATHUR; NARANG, 1990).

Assim o uso de indutores de resistência a doenças caracteriza uma medida alternativa, buscando o desenvolvimento sustentável dentro dos princípios agroecológicos proporcionando uma significativa redução dos impactos ambientais que os agroquímicos vêm causando ao longo dos anos.

Na perspectiva de mudar o panorama no qual se encontra o Estado do Maranhão, em relação à produção de tomate e o desequilíbrio ambiental, buscou-se estudar a indução de resistência como alternativa ecológica no controle da fusariose do tomateiro, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, validando o processo indutivo pela avaliação qualitativa e quantitativa das enzimas envolvidas no processo de redução da severidade da doença.

O Hospedeiro: Tomate

O tomate é uma hortaliça muito popular na gastronomia mundial. Pode ser consumido *in natura* ou em derivados, sendo apreciado em vários países, tanto pela qualidade de sabor, quanto também pela grande concentração de substâncias benéficas ao organismo humano, como por exemplo o licopeno, que está associada à prevenção do câncer de próstata (LOPES, 2005).

O tomateiro pertence à classe Dicotyledoneae, ordem Tubiflorae e família Solanaceae. Originalmente, de acordo com Linnaeus, o tomateiro foi inicialmente integrado ao gênero *Solanum*, recebendo a denominação *Solanum lycopersicon* L.. Entretanto em 1754, Miller, reclassificou o tomateiro, criando um novo gênero denominado *Lycopersicon*, renomeando o tomateiro cultivado como *Lycopersicon esculentum* Mill. (ALVARENGA, 2004). Contudo, estudos baseados em técnicas moleculares utilizando DNA mitocondrial, demonstraram que os tomateiros e as espécies do gênero *Solanum*, tais como as batatas, estão muito relacionados filogeneticamente, apoiando desta forma a inclusão das espécies de tomate novamente dentro do gênero *Solanum*, retornando para a nomenclatura inicialmente imposta por Linnaeus (*S. lycopersicon* L.), gerando muitas divergências entre botânicos adeptos à taxonomia clássica e adeptos de técnicas mais modernas (PERALTA; SPOONER, 2000).

A floração e a frutificação ocorrem juntamente com o crescimento vegetativo. As folhas pecioladas são compostas por números ímpares de folíolos. Possui sistema radicular constituído de raiz principal, raízes secundárias e raízes adventícias (ALVARENGA, 2004). A planta apresenta dois hábitos de crescimento que condiciona o tipo de cultura: o indeterminado, caracterizado pelo crescimento rasteiro e com produção voltada ao aproveitamento industrial, e o determinado, que possui crescimento ereto e é comumente consumido “*in natura*”. As flores agrupam-se em cachos e são hermafroditas. Normalmente a planta é autopolinizada, apresentando baixa incidência de frutos.

Os frutos são bagas carnosas e suculentas, bi, tri ou plurilocular, que se desenvolve a partir de um ovário com 5-10 mg de peso e alcança, quando maduro, peso final entre 5 e 500 g, dependendo da cultivar e das condições de desenvolvimento (ALVARENGA, 2004). Após amadurecimento, são de um vermelho vivo em razão do acúmulo do carotenóide licopeno. As sementes são pilosas pequenas e o sistema radicular é condicionado pelo tipo de cultura (FILGUEIRA, 2000).

Em 2011, o Brasil produziu 4,4 milhões de toneladas de tomate, havendo um aumento tanto da produção quanto na área plantada da cultura em relação ao ano de 2010. A região Nordeste destacou-se como a terceira maior produtora, com uma produção de 622.215 toneladas deste fruto. Dentre os Estados do Nordeste, o Maranhão ocupa a 6º posição na produção de tomate com 4.739 toneladas em 228 hectares de área plantada (IBGE, 2011).

O Patógeno: *Fusarium*

O gênero *Fusarium* pertence atualmente ao filo Ascomycota, classe Ascomycetes e ordem Hypocreales. Espécies fitopatogênicas distribuídas dentro do gênero *Fusarium*, dentre as quais *F. oxysporum*, tem sua fase teleomórfica desconhecida, sendo uma espécie grupo composta de dezenas de espécies que necessitam ser claramente definidas e separadas de maneira adequada. Além de importante patógeno de planta, *F. oxysporum* tem sido associado com várias doenças humanas que incluem infecções da córnea, diversos tipos de dermatites, infecções localizadas e sistêmicas (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

As espécies de *Fusarium* que causam murchas vasculares em plantas são todas classificadas como *Fusarium oxysporum* (ALEXOUPOULOS et al., 1996), que forma um complexo de fungos habitantes de solo, compostos por parótipos classificados em várias *formae speciales*, com base em critério patogênico. Cada grupo de *formae speciales* é patogênico a uma espécie ou a um grupo de plantas em particular, demonstrando o elevado grau de especificidade de hospedeiro (NELSON et al., 1983).

Dentre algumas doenças de importância econômica podem ser citadas: murcha-do-algodoeiro (*F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*), Fusariose do tomateiro (*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*), murcha-da-bananeira (*F. oxysporum* f. sp. *cubense*) e murcha-de-fusarium-do-feijoeiro (*F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*) (BEDENDO, 1995).

Das formas especializadas de *F. oxysporum*, uma das mais importantes em hortaliças no Brasil tem sido a espécie *Fusarium oxysporum* Schlechtend.:Fr. f. sp. *lycopersici* (Sacc.) W.C Snyder & H.N. Hansen, causadora da Fusariose do tomateiro (REIS; LOPES, 2007). O agente causal desta doença recebeu inicialmente a denominação *Fusarium oxysporum* Achal. subsp. *lycopersici* Sacc., 1886. Depois o denominaram *Fusarium lycopersici* Sacc. em 1935 e foi novamente classificado recebendo a denominação de *Fusarium bulbigenum* (Cke. e Mass.) Wr. e Reinking, em 1935. Finalmente, o nome do patógeno foi reclassificado e fixado como *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) W.C Snyder & H.N. Hansen, em 1940 (VALE et al., 2000).

A espécie *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* é agrupada em três raças fisiológicas (1, 2 e 3) conforme as suas habilidades de infectar e causar doença em uma série de cultivares possuidoras de genes em diferentes *loci* de resistência (BOHN; TUCKER, 1940). A Fusariose do tomateiro em espécies do gênero *Solanum* está restrita às espécies *Solanum lycopersicon* L. e *Solanum pimpinellifolium* L., muito embora possa afetar outras solanáceas ornamentais malváceas e gramíneas (VALE et al., 2000).

O fungo *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* apresenta micélio septado, colônias pouco coloridas inicialmente, mas com a idade tornam-se amarelas, com aspecto pálido e, sob determinadas condições, adquire cor rosa pálida ou coloração purpúrea (VALE et al., 2000). Nesta espécie são produzidos dois tipos de esporos assexuais, os microconídios e macroconídios, além de estruturas de resistência denominadas clamidósporos (AGRIOS, 2005). Os microconídios são produzidos abundantemente em fiáldes simples, apresentando formato oval a elipsóide, ligeiramente curvados e sem septos, medindo 5,5-14,5 μm x 2-3,5 μm (média 5,7 x 2,6 μm). Os macroconídios são esparsos a abundantes, produzidos em conidióforos ou na superfície de esporodóquios, apresentando formato fusóide e pontiagudos nas extremidades, com as paredes finas e três a cinco septos, medindo 23,5-36 μm x 3,5-5,5 μm (média 31,2 x 39 μm). Os clamidósporos apresentam paredes espessas, duplas e rugosas, formato globoso e podem ser formados isolados ou nas extremidades de conidióforos ou intercalados nas hifas ou nos macroconídios, constituindo as estruturas de resistência (NELSON et al., 1983; LESLIE; SUMMERELL, 2006). É comum aparecer macroconídios na superfície das plantas mortas pelo patógeno, formando agrupamentos semelhantes aos esporodóquios (AGRIOS, 2005).

Os clamidósporos de *F. oxysporum* podem ter uma ou duas células (KUROSAWA; PAVAN, 1997). Estes esporos são resultantes da transformação das hifas, medindo de 7-11 μm (VALE et al., 2000). Clamidósporos são considerados estruturas de resistência do patógeno e podem permanecer viáveis no solo na ausência do hospedeiro por anos. Reforçando a importância da adoção de medidas que impeçam a entrada do fungo em áreas onde ainda não foi constatada a patologia (COSTA et al., 2007).

Descrição da Doença: Fusariose do Tomateiro

A Fusariose do tomateiro é uma doença que ocorre em todos os estados brasileiros, causando drástica redução na colheita, morte prematura das plantas ou destruição de todas as plantas (JULIATTI, 2001).

A primeira ocorrência de fusariose do tomateiro no Brasil foi em 1938, no município de Pesqueira, Sertão de Pernambuco (DESLANDES, 1940). Atualmente, encontra-se amplamente distribuída em todo o território nacional, provocando destruição quase total das plantas ou reduzindo drasticamente o período de colheita e produtividade da lavoura, devido à queda prematura dos frutos e elevada mortalidade de plantas.

Este fungo é morfológicamente similar a outros membros da espécie *F. oxysporum*, mas separado por sua especialização fisiológica e patológica ao tomateiro (CORRELL, 1992; KATAN et al., 1994) e sobrevive entre as estações de cultivo do tomateiro, permanecendo dormente na forma de clamidósporos em tecidos deteriorados do hospedeiro e no solo (NELSON, 1981).

Os clamidósporos germinam sobre as raízes da planta e o tubo germinativo resultante deste processo penetra diretamente no interior da planta através de ferimentos. Após ocorrer a adesão de hifas nas células epidermais e corticais do hospedeiro, estas são penetradas por hifas constrictas que causam degradação local da parede celular (BECKMAN, 1987). A penetração ocorre mais frequentemente através das extremidades de raízes, onde aberturas naturais na parede celular ou ferimentos provocados pelo atrito das raízes com o solo provêm uma entrada para o tecido vascular em desenvolvimento (NELSON, 1981).

Após a penetração, as hifas crescem em direção aos vasos do xilema e passam a se desenvolver no seu interior, colonizando as células do feixe vascular, produzindo esporos e promovendo a distribuição sistêmica do fungo pela planta, através da corrente ascendente de seiva bruta. Com a evolução da colonização, ocorre o bloqueio dos vasos infectados, limitando parcial ou totalmente a passagem da água e elementos minerais para a parte aérea da planta (BECKMAN, 1987). O nível de extensão da colonização no hospedeiro por *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* determina o grau de expressão dos sintomas (GAO et al., 1995).

Os sintomas mais evidentes da doença são o amarelecimento das folhas, a partir das mais velhas, seguido de murcha da planta (LOPES; SANTOS, 1994). Externamente, os sintomas da Fusariose do tomateiro iniciam-se pelas folhas basais que perdem a turgidez, tornam-se amareladas, apresentam crestamento do limbo e, finalmente, caem. Quando se corta transversalmente a raiz ou o caule de uma planta doente, pode-se observar o típico escurecimento de vasos, que evidencia a presença do patógeno (NELSON, 1981).

O escurecimento dos feixes vasculares resulta da oxidação e polimerização de hidroxifenóis e ação da oxidase, embora as toxinas produzidas pelo fungo possam estar envolvidas indiretamente na exibição da murcha, tendo em vista servirem como incitadores de mecanismos de resistência do hospedeiro, tal como a deposição de géis e tiloses, que podem obstruir os vasos do xilema e contribuir para a síndrome da doença (BECKMAN, 1987).

Com a morte da planta, clamidósporos são produzidos e permanecem dormentes até que as condições sejam favoráveis ao seu desenvolvimento. Os clamidósporos podem ser disseminados, na área de plantio, através do movimento de solo provocado por vento, água ou implementos. A disseminação local do patógeno também ocorre através da água de irrigação,

mudas infectadas ou solo infestado da sementeira. A disseminação a longa distância ocorre através de mudas infectadas ou via sementes, no interior ou na superfície das mesmas (BECKMAN, 1987; JONES, 1991; KUROSAWA; PAVAN, 1997; AGRIOS, 2005).

Estratégias de Manejo de Doenças

As medidas preconizadas para o controle da Fusariose do tomateiro envolvem: a) uso de cultivares resistentes; b) manipulação da fertilidade do solo, como adicionar calcário para obter pH no mínimo 7,0; evitar o uso de micronutrientes; evitar o uso excessivo de fósforo e magnésio; usar nitrogênio na forma de nitrato, evitando a forma amoniacal; aplicar fertilizantes em faixas próximas às raízes e não diretamente na cova; c) impedir a drenagem de água de local infestado para novas áreas de plantio; d) permitir que o solo repouse antes do plantio; e) uso da rotação de culturas com plantas não hospedeiras por cinco a sete anos; f) prevenir a disseminação do patógeno eliminando o movimento de solo infestado, bem como o trânsito de máquinas, animais e operários de lavouras doentes para áreas livres da doença; g) eliminar os restos culturais diminuindo, assim, o inóculo inicial para o próximo ciclo da cultura (BECKMAN, 1987; JONES, 1991; LOPES; SANTOS, 1994).

O controle da maioria das doenças da cultura do tomateiro é feito através do uso indiscriminado de fungicidas, com aplicação de superdosagens e/ou números excessivos de aplicação, o que caracteriza riscos à saúde humana, principalmente quando há o desrespeito do período de carência, bem como riscos ao ambiente, caracterizados principalmente pelos longos períodos de persistência dos princípios ativos no ambiente, além de desequilíbrio ou desregulação de processos ecológicos essenciais para o funcionamento do agroecossistema. Segundo NAGARAJKUMAR et al. (2004), existe a necessidade de novas formas de controle, uma vez que o controle químico possui difícil execução e elevados custos, podendo resultar em contaminações do solo, bem como no surgimento de populações resistentes do patógeno.

Os problemas ambientais têm comprometido a produção de alimentos. Esta, por sua vez, tem sido apontada como um dos responsáveis por danos ao ambiente e à saúde humana em decorrência do uso indiscriminado de agroquímicos, que também possibilita aos patógenos adquirirem resistência a determinado produto. Os consumidores por sua vez fazem restrições aos alimentos produzidos com base nos agroquímicos. Segundo COSTA e CAMPANHOLA (1997), a conservação do meio ambiente, além de ter um benefício social, tende a tornar-se um componente importante, gerando competitividade entre os produtos

atualmente presentes no mercado. Isso tem levado a busca de alternativas sustentáveis, como a indução de resistência como medida de defesa vegetal à ocorrência de patógenos.

Indução de Resistência

A resistência do hospedeiro a uma doença pode ser definida, sob o aspecto fisiológico, como a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e/ou a subsequente atividade de um patógeno nos tecidos da mesma (AGRIOS, 2005).

As plantas são continuamente expostas a um grande número de patógenos, como resultado, apresentam um complexo mecanismo de defesa para reconhecer e se proteger, através do desenvolvimento de barreiras, como mecanismos de defesa pré e pós-formados que restringem a infecção/colonização. Em ambas as categorias, os fatores envolvidos na resistência podem ser subdivididos em estruturais ou bioquímicos. Os estruturais atuam como barreiras físicas, enquanto os bioquímicos atuam através da produção de substâncias tóxicas ou repelentes ao patógeno ou criando condições adversas ao estabelecimento deste na planta (SBALCHEIRO, 2006; MAZARO, 2007).

A indução de resistência é uma medida alternativa que pode ser utilizada no manejo integrado de doenças, principalmente naquelas onde o controle químico é ainda pouco efetivo (PASCHOLATI, 2003). Apesar da indução de resistência ser estudada desde o início do século XX (ARAÚJO et al., 2003), apenas recentemente suas potencialidades para o controle de doenças tem sido destacadas (GÖRLACH et al., 1996; CAVALCANTI et al., 2005).

Indutores podem ser usados para ativar mecanismos de defesa por meio de ação direta de moléculas elicitoras ou da indução da ativação de genes que codificam a síntese de fatores de resistência. Na indução da resistência, mecanismos latentes de defesa da planta são ativados por agentes indutores biológicos, físicos ou químicos (EL-GHAOUTH et al., 1998). Uma vez ativada, a resistência confere proteção inespecífica, caracterizada não somente pelos diferentes indutores que podem ser utilizados, como pelo amplo espectro de patógenos contra os quais a planta fica protegida (STICHER et al., 1997).

Quando o controle acontece por intermédio da indução de resistência, normalmente possui duas características altamente desejáveis: a amplitude da eficiência, que consiste na proteção contra múltiplos patógenos; e a ação sistêmica, característica que confere defesa além da região de aplicação do indutor, a planta como um todo manifesta o estado indutivo.

Esse estado é denominado de “condicionamento” ou “sensibilização”, uma vez que a planta responde com mais eficiência e eficácia contra as tentativas de colonização pelo

patógeno (STICHER et al., 1997). Quando a planta é induzida pela presença de um elicitor, são perceptíveis alterações em seu metabolismo. Porém, quando comparada à uma planta induzida com mesmo elicitor e posteriormente desafiada com o patógeno, nota-se que as alterações no metabolismo são mais intensas do que na planta apenas desafiada ou apenas induzida, evidenciando-se que a planta está mais capacitada para responder a presença do patógeno.

A presença do patógeno, após a indução, altera a expressão dos eventos bioquímicos, bem como, promove o acionamento de outros mecanismos, enquanto que plantas não induzidas e inoculadas com o patógeno apresentam menor magnitude desses eventos bioquímicos. Dessa forma, quando as plantas são pré-inoculadas com um microorganismo, embora pouco se observe em termos de alterações bioquímicas, a planta sistematicamente protegida reage de forma mais rápida e eficientemente ao desafio com um patógeno virulento (STICHER et al., 1997; HEIL; BOSTOCK, 2002).

Essas relações reforçam a complexidade envolvida na indução de resistência, com a ativação de vários processos, incluindo hipersensibilidade, barreiras estruturais, aumento da síntese de fitoalexinas e acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese (PRPs), como a hidrolase beta-1,3-glucanase, que degrada paredes celulares de patógenos fúngicos (HAMMERSCHMIDT, 1999). Esses sinais percorrem toda a planta, sistemicamente ou induzindo sua síntese em cadeia, num processo de autogenia. Genes de resistência, até o momento inativos, são ativados e se expressam para a síntese dos componentes de resistência (VAN LOON et al., 1998).

A reação de hipersensibilidade em plantas é considerada como um dos principais eventos da resposta de defesa da planta contra o ataque de patógenos, se caracterizando por ser uma resposta rápida e localizada, ou seja, que ocorre no sítio de infecção do patógeno. Dentre as principais características da resposta estão o rápido e localizado colapso do tecido vegetal ao redor do sítio de infecção, ocasionado pela liberação de compostos tóxicos, os quais também atuam, em alguns casos, diretamente sobre o patógeno, ocasionando sua morte (AGRIOS, 2005). Ela envolve sucessivos eventos e sinais que compreendem desde o reconhecimento entre o patógeno e o hospedeiro até o colapso celular vegetal localizado. Caracterizando a primeira etapa da resposta de defesa da planta, sendo seguida de outras alterações, quer seja no sítio de infecção ou em toda a planta (VERBENE et al., 2000).

Para autoridades mundiais é notória a distinção de dois tipos de indução de resistência quanto ao meio da qual são induzidos, bem como dos mecanismos bioquímicos envolvidos,

porém semelhantes quanto ao objetivo proposto: responder fenotipicamente à indução, não somente no local de exposição ao indutor, mas também em outros sítios da planta.

As diferentes vias de ativação de resistência foram descobertas quando avaliou-se diferentes respostas bioquímicas a indutores como a rizobactéria *Pseudomonas fluorescens*. Essas rizobactérias induzem a resistência sistêmica induzida (RSI) que é independente do ácido salicílico e não está associada com a ativação dos mesmos genes da RSA. Em substituição ao AS, a RSI requer, para a sua ativação, o aumento dos níveis de AJ e etileno (BOSTOCK, 2005). No entanto, independente do agente biótico indutor, a comunicação cruzada entre as diferentes rotas já foi demonstrada (HEIL; BOSTOCK, 2002).

Assume-se que Resistência Sistêmica Adquirida (RSA/SAR - “Systemic Acquired Resistance”) envolve o acúmulo de PRPs como mecanismo de defesa da planta, sua indução é salicilato dependente, podendo resultar em alterações visuais (necroses, por exemplo) e geralmente é induzida por patógenos ou ativadores químicos. No caso da Resistência Sistêmica Induzida (RSI/ISR - “Induced Systemic Resistance”), não há acúmulo de PRPs, a planta que sofreu indução não exhibe alterações, o agente elicitador é usualmente um microrganismo não-patogênico e o fenômeno não é salicilato dependente, parecendo haver outra rota de sinalização associada a jasmonatos e etileno (ROMEIRO; GARCIA, 2009).

Os genes de resistência estão associados com o aumento do ácido salicílico (AS), ácido jasmônico (AJ) e etileno (ET) (JALALI et al., 2006). A resistência sistêmica adquirida (RSA) está associada ao AS, o qual é o sinalizador para a expressão de certas proteínas relacionadas à patogenicidade (GRÜNER et al., 2003; GLAZEBROOK, 2005).

O principal papel fisiológico atribuído ao AS na planta é o de funcionar como uma molécula sinalizadora, induzindo-a a expressar resistência contra o ataque de predadores. Esta função foi sugerida em decorrência do AS se acumular em plantas submetidas a condições adversas, quer seja por ataque patogênico, quer pelo tratamento da planta com elicitores químicos, e por sua propriedade de induzir a expressão de genes ligados a várias PR-Proteínas (MARTINEZ et al., 2000).

O ácido jasmônico (AJ) e seus derivados (jasmonatos) estão relacionados a mecanismos de defesa vegetal. Eles induzem a expressão de genes que codificam proteínas específicas, como inibidores de proteases, enzimas envolvidas com a produção de flavonoides, bem como diferentes proteínas relacionadas com doenças (CORTÊS, 2000), desempenhando ainda papel importante na defesa das plantas contra danos causados por raios UV-B (SCHALLER, 2001).

Morfológica e fisiologicamente, os jasmonatos apresentam tanto efeito promotor como inibidor nos vegetais, sendo alguns destes efeitos semelhantes àqueles causados pelo ácido

abscísico e pelo etileno. Existem estudos mostrando a ação dos jasmonatos sobre a senescência, acúmulo de proteínas de armazenamento, desenvolvimento de embriões e biossíntese de metabólitos secundários (CARLETTI et al., 1999).

O etileno está envolvido nos processos de resposta a estresses de caráter biótico ou abiótico como ataques de patógenos e injúrias nos tecidos vegetais e pode estar associado a outros hormônios como auxina, AJ, AS. O etileno também pode ajudar a planta a distinguir um simbionte benéfico de um patogênico (LYNCH; BROW, 1997).

As alterações enzimáticas podem estar relacionadas aos aspectos fisiológicos combinados a indução de resistência da planta a doenças. Vários relatos demonstram a relação existente entre expressão da resistência sistêmica induzida e enzimas como peroxidase, polifenoloxidase, fenilalanina amônia-liase, β -1,3-glucanase e quitinase (VAN LOON et al., 1998).

Diveros agentes podem induzir a produção de sinais no vegetal, disparando reações que culminarão em proteção duradoura contra uma ampla gama de fitopatógenos (SOBRINHO et al., 2005). O composto sintético éster-S-metil do ácido benzo-(1,2,3)-tiadiazol-7-carbotióico (acibenzolar-S-metil, ASM, BTH, CGA 245704, Bion®, Actigard®), derivado do benzotiadiazol, é um análogo do ácido salicílico e tem sido amplamente estudado como agente indutor da RSA (TERRY; JOYCE, 2004).

A indução de resistência com a utilização de quitosana foi demonstrada em diversas culturas como o feijoeiro, em que o elicitor provocou o aumento na atividade de glucanase (DI PIERO; GARDA, 2008). Na avaliação do efeito da quitosana na indução de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, em plantas de caupi, verificou-se a redução da severidade da doença e o aumento da atividade da fenilalanina amônia-liase e β -1,3-glucanase (RODRIGUES et al., 2006). CAVALCANTI et al. (2006) avaliaram alguns indutores, entre eles a suspensão de quitosana proveniente de micélio de *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora, e obtiveram proteção em plantas de tomateiro atacadas por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

O tratamento de algumas plantas com extrato aquoso de nim proporcionou um controle de muitas doenças fúngicas através de alterações metabólicas em plantas, incluindo a indução de enzimas de biossíntese de fenol, enzima antioxidante defensiva e acúmulo de fenol, atividade de peroxidase, catalase e superóxido dismutase (GULERIA; KUMAR, 2006; ABOELLIL, 2007; FARAG HANAA et al., 2011).

O Biopiról é um fertilizante foliar e/ou radicular de alto desempenho à base de extrato pirolenhoso. A solução orgânica é originada da carbonização da madeira, que apresenta

algumas semelhanças com os ácidos húmicos, por serem ambos derivados da transformação da lignina e de outros componentes de resíduos vegetais (COELHO et al., 2003). O produto, assim como o ASM, não apresenta efeito sobre o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (CRUZ et al., 2011).

O Agro-Mos também é apresentado na literatura como efetivo controlador de doenças, tais como antracnose, podridão de *Lasioidiplodia* e de *Fusarium* em mamão, bem como Oídio em videira (DANTAS et al., 2004; GOMES et al., 2007). Ele é caracterizado como um produto composto de sólidos solúveis oriundo de fermentação, rico em nutrientes, aminoácidos e vitaminas que estimulam os processos fisiológicos e de resistência das plantas (IMPROCROP, 2012).

Mecanismos Bioquímicos envolvidos na Indução de Resistência

O envolvimento de macromoléculas em interações patógeno-planta, do ponto de vista de resistência e de fisiologia do parasitismo, é conhecida há bastante tempo, seja como mecanismos pré-existent (AGRIOS, 2005) seja como pós-formados (STICHER et al., 1997).

As plantas respondem ao ataque de patógenos ativando múltiplos mecanismos de defesa para proteger-se da infecção. Muitas vezes, essas rápidas respostas celulares são provocadas pelo reconhecimento de agentes patogênicos específicos (elicitors) e a ativação de caminhos de transdução altamente regulados. O objetivo principal desses caminhos é o núcleo da célula, onde os sinais levam à ativação de uma grande quantidade de genes de defesa (MALECK et al., 2000). Os produtos desses genes incluem proteínas relacionadas ao patógeno bem como enzimas implicadas na biossíntese de metabólitos protetores secundários.

A resistência sistêmica adquirida (RSA) envolve indução de mecanismos de defesa latentes que conferem proteção contra um amplo espectro de microrganismos (RYALS et al., 1996; DURRANG; DONG, 2004). Tal ativação pode ser obtida pelo tratamento da planta com agentes bióticos como uso de microrganismos viáveis ou atenuados (STANGARLIN; PASCHOLATI, 1994; SILVA et al., 2007; MACAGNAN et al., 2008; STADNIK; PAULERT, 2008; SCHWAN-ESTRADA et al., 2012; STADNIK; FREITAS, 2012) ou com agentes abióticos como o ácido salicílico (HAMMERSCHMIDT; DANN, 1997), ácido aminobutírico (COHEN, 1996), ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA) (HIJWEGNWN et al., 1996) e acibenzolar-S-metil (ASM) (CAVALCANTI et al., 2006). Atualmente, outras substâncias como quitosana (RODRIGUES et al., 2006), fosfitos (LOPEZ; LUCAS, 2002),

silicatos (DANTNOFF et al., 1992) e extratos vegetais (FELIPE; BACH, 2004; VIGOSCHULTZ et al., 2006) têm sido testadas como indutores de resistência.

Segundo LEON-KLOOSTERZIEL et al. (2005), uma grande variedade de enzimas está relacionada com a resistência induzida, tais como peroxidases, polifenoloxidasas, fenilalanina amônia-liases, lipoxigenases, β -1,3-glucanases e quitinases. Assim, quando uma planta é levada ao estado de indução, a atividade dessas enzimas ou, pelo menos de algumas delas, tende a aumentar em relação às atividades em tecidos de plantas não expostas a elicitores.

Dependendo da planta e do agente de indução, essas substâncias acumulam-se tanto nos espaços intercelulares (quando teriam uma ação direta sobre o patógeno) como em vacúolos (quando teriam ação após eventos de patogênese que culminam com a descompartimentalização). Geralmente PRPs possuem potente atividade antimicrobiana “*in vitro*” (ENKERLI et al., 1993; PONSTEIN et al., 1994; HU et al., 1997; STICHER et al., 1997) e é de se presumir que também possam controlar patógenos “*in vivo*” (VAN LOON, 1983; HERBERS et al., 1996; KLOEPPER, 1996). PRPs estimulam a liberação de elicitores de fitoalexinas (KUC, 1985; BOL et al., 1990; NEUENSCHWANDER et al., 1995) e induzem a síntese de compostos fenólicos (KEEN; YOSHIKAWA, 1983; KUROSAKI et al., 1986).

Quitinases e β -1,3-glucanases, por exemplo, degradam a parede celular de patógenos liberando moléculas que agem como elicitoras, nas etapas iniciais do processo de indução de resistência (VAN LOON et al., 1998), dessa forma apresentam ação direta e imediata de defesa sobre o patógeno.

Peroxidasas têm afinidade por substratos envolvidos na lignificação celular e, além disso, seus produtos têm atividade antimicrobiana direta na presença de peróxido de hidrogênio (STICHER et al., 1997) ao passo que fenilalanina-amônia-liases também gera precursores para a biossíntese de lignina e de outros compostos fenólicos que se acumulam em resposta à infecção (KLESSIG; MALAMY, 1994).

Polifenoloxidasas têm a propriedade de oxidar compostos fenólicos a quinonas, as quais geralmente são mais tóxicos aos microrganismos que os compostos fenólicos originais (STICHER et al., 1997). Estas enzimas permanecem de no espaço intracelular, compartimentalizadas dentro dos tilacóides nos cloroplastos, e em sua grande maioria em estado inativo (VAUGHN et al., 1988). Quando liberadas, iniciam o processo de oxidação de compostos fenólicos, que também são liberados dos vacúolos, produzindo quinonas, na medida em que ocorre a ruptura da célula, ocasionada por ferimentos, ação de insetos ou patógenos, ou ainda senescência (MACHEIX et al., 1986; CONSTABEL et al., 1995;

MOHAMMADI; KAZEMI, 2002; THIPYAPONG et al., 2004) e também participam do processo de lignificação durante a invasão por patógenos (JUNG et al., 2004).

O papel destas enzimas no processo de defesa é reforçar a parede celular a partir da formação de lignina, suberina, polissacarídeos ferulicolados e glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (BOWLES, 1990), aumento na produção de espécies ativas de oxigênio que apresentam ação antimicrobiana, bem como atuam na sinalização (KAWANO; MUTO, 2000; RESENDE et al., 2003), incitando a formação de fitoalexinas (KRISTENSEN et al., 1999), participando também na peroxidação de lipídios que apresentam papel na sinalização, induzindo o acúmulo de AS (LÉON et al., 1995).

REFERÊNCIAS

- ABOELLIL, A. H. Trilogy, a product of neem (*Azadirachta indica*) induces resistance in cucumber against *Podospaera xanthi*. **Research Journal of Microbiology** v. 2, n. 2, p. 402-414, 2007.
- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5. ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. 922p.
- ALEXOUPoulos, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4 ed. New York: John Wiley & Sons Inc, 1996. 880p.
- ALVARENGA, M. A. R. Origem, botânica e descrição da planta. In: ALVARENGA, M. A. R. e AL., E. (Ed.). **Tomate: produção em campo, em casa-de-vegetação e em hidroponia**. Lavras: Editora UFLA, 2004. p.15-18.
- ARAÚJO, J. S. P.; ROBBS, C. F.; RIBEIRO, R. L. D. Manejo integrado de fitobacterioses de importância econômica no Brasil. In: LUZ, W. C.; FERNANDES, J. M. C., *et al* (Ed.). **Revisão anual de patologia de plantas**, v.11, 2003. p.107-131.
- BECKMAN, C. H. **The nature of wilt diseases of plants**. St. Paul: APS Press, 1987. 175p.
- BEDENDO, I. P. Podridões de raiz e colo. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H., *et al* (Ed.). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.1, 1995. p.838-847.
- BOHN, G. W.; TUCKER, C. M. Studies on Fusarium wilt of the tomato: Immunity in *Lycopersicon pimpinellifolium* Mill. and its inheritance in hybrids. **Agricultural Experimental Station Research Bulletin**, Missouri, n. 311, p. 82, 1940.
- BOL, J. F.; LINTHORST, H. J. M.; CORNELISSEN, B. J. C. Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 28, p. 113-38, 1990.
- BOSTOCK, R. M. Signal crosstalk and induced resistance: Straddling the between cost and benefit. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 545-580, 2005.
- BOWLES, D. J. Defense-related proteins in higher plants. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 59, p. 837-907, 1990.
- CARLETTI, R.; MORAES, D. M.; VILLELA, F. A. Jasmonato: Influência na germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 21, p. 183-186, 1999.
- CAVALCANTI, F. R.; RESENDE, M. L. V. D.; PEREIRA, R. B.; COSTA, J. D. C. D. B.; CARVALHO, C. P. D. S. Atividades de quitinase e beta-1,3-glucanase após eliciação das defesas do tomateiro contra a mancha-bacteriana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 1721-1730, 2006.

CAVALCANTI, L. S.; BRUNELLI, K. R.; STANGARLIN, J. R. Aspectos moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M. C., P., *et al* (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: Fealq, 2005. p.81-124.

COELHO, R. R. R.; BENITES, V. M.; BOM, E. P. S.; SACRAMENTO, D. R. **Avaliação do crescimento de actinomiceto em substratos contendo subprodutos da carbonização vegetal visando a produção de ácidos húmicos**. UFPR: Grupo Brasileiro da IHSS, 2003. 15p.p.

COHEN, L. Y. Induced resistance against fungal diseases by aminobutyric acids. In: LYR, H.; RUSSEL, P. E., *et al* (Ed.). **Modern Fungicides and antifungal compounds**. Andover: Intercept, 1996. p.461-466.

COHEN, Y.; REUVENI, M.; BAIDER, A. Local and systemic activity of BABA (DL-3-aminobutyric acid) against *Plasmopara viticola* in grapevines. **European Journal of Plant Pathology**, v. 105, p. 351-361, 1999.

CONSTABEL, C. P.; BERGEY, D. R.; RYAN, C. A. Systemin activates synthesis of woundinducible tomato leaf polyphenol oxidase via the octadecanoide defense signaling pathway. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, Washington, v. 92, p. 407-411, 1995.

CORRELL, J. C. Genetic, biochemical, and molecular techniques for the identification and detection of soilborne plant-pathogenic fungi. In: SINGLETON, L. L.; MIHAIL, J. D., *et al* (Ed.). **Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi**. St. Paul: APS Press, 1992. p.7-16.

CORTÊS, H. Introdução aos hormônios Vegetais. **Embrapa**, p. 131-157, 2000.

COSTA, H.; ZAMBOLIM, L.; VENTURA, J. A. Doenças de hortaliças que se Constituem em desafio para o controle. In: ZAMBOLIM, L. E. A. (Ed.). **Manejo integrado de doenças e pragas: hortaliças**. Viçosa: Editora UFV, 2007. p.319-336.

COSTA, M. B. B.; CAMPANHOLA, C. A. **Agricultura alternativa no Estado de São Paulo**. Embrapa - CNPMA, p.63. 1997. (Série Documentos, 7)

CRUZ, S. M. D. C.; RODRIGUES, A. A. C.; COELHO, R. S. B.; SARDINHA, D. H. S. Ação indutora de produtos abióticos na resistência de tomateiro e efeito sobre o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. **Idesia**, Chile, v. 29, n. 2, p. 111-118, 2011.

DANTAS, S. A. F.; OLIVEIRA, S. M. A.; BEZERRA NETO, E.; COELHO, R. S. B.; SILVA, R. L. X. Indutores de resistência na proteção do mamão contra podridões pós-colheita. **summa Phytopathologica**, v. 30, p. 314-39, 2004.

DANTNOFF, L. E.; SNYDER, G. H.; DEREN, C. W. Influence of silicon fertilizer grades on blast and brown spot development and on rice yields. **Plant Disease**, v. 76, p. 1182-1184, 1992.

DESLANDES, J. A. **Doenças do tomateiro no Nordeste**. Boletim da Sociedade Brasileira de Agronomia. Rio de Janeiro, p.442-453. 1940

DI PIERO, R. M.; GARDA, M. V. Quitosana reduz a severidade da antracnose e aumenta a atividade de glucanase em feijoeiro-comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 1121-1128, 2008.

DURRANG, W. E.; DONG, X. Systemic Acquired Resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 42, n. 185-209, 2004.

EL-GHAOUTH, A.; WILSON, C. L.; WISNIEWSKI, M. Ultrastructural and cytochemical aspects of the biological control of Botrytis cinerea by *Candida saitoana* in apple fruit. **Phytopathology**, v. 88, p. 282-291, 1998.

ENKERLI, J.; GISI, U.; MOSINGER, E. Systemic acquired resistance to *Phytophthora infestans* in tomato and the role of pathogenesis related proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 43, p. 161-171, 1993.

FARAG HANAA, R. M.; ABDOU, Z. A.; SALAMA, D. A.; IBRAHIM, M. A. R.; SROR, H. A. M. Effect of neem and willow aqueous extracts on fusarium wilt disease in tomato seedlings: Induction of antioxidant defensive enzymes. **Annals of Agricultural Science**, v. 56, p. 1-7, 2011.

FELIPE, T. A.; BACH, E. E. **Extrato de manjeriço como indutor de resistência em plantas de cevada (variedade Embrapa 128) contra *Bipolaris sorokiniana***. Arquivos do Instituto Biológico, p.1-749. 2004

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo Manual de Olericultura: Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa: UFV, 2000. 421p.

GAO, H.; BECKMAN, C. H.; MUELLER, W. C. The rate of vascular colonization as a measure of the genotypic interaction between various cultivars of tomato and various formae or races of *Fusarium oxysporum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 46, p. 29-43, 1995.

GLAZEBROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 205-227, 2005.

GOMES, E. C. S.; PEREZ, J. O.; BARBOSA, J.; NASCIMENTO, E. F.; AGUIAR, I. F. Efeito de indutores de resistência na proteção de uva "Itália" e uva de vinho "Cabernet Sauvignon" contra o oídio e o míldio no Vale do São Francisco. II Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica, 2007. João Pessoa PB.

GÖRLACH, J.; VOLRATH, S.; KNAUF-BEITER, G.; HENGY, G.; BECKHOVE, U.; KOGEL, K. H.; OOSTENDORP, M.; STAUB, T.; WARD, E.; KESSMANN, H.; RYALS, J. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. **The Plant Cell**, v. 8, p. 629-643, 1996.

GRÜNER, R.; G., S.; PFITZNER, A. P.; PFITZNER, U. M. Salicylic acid and the hypersensitive response initiate distinct signal transduction pathways in tobacco that converge on the as-1-like element of the PR-1a promoter. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 270, p. 4876-4886, 2003.

GULERIA, S.; KUMAR, A. Azadirachta indica leaf extract induces resistance in sesame against Alternaria leaf spot disease. **Journal of Cell and Molecular Biology**, v. 5, p. 81-86, 2006.

HAMMERSCHMIDT, D.; DANN, E. K. Induced resistance to disease. In: ECHCIGL, N. A. e REHCIGL, J. E. (Ed.). **Environmentally safe approaches to crop disease control**. Boca Raton: CRC – Lewis Publishers, 1997. p.177-99.

HAMMERSCHMIDT, R. Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? **Physiology and Molecular Plant Pathology**, v. 55, p. 77-84, 1999.

HEIL, M.; BOSTOCK, M. R. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. **Annals of botany**, Londres, v. 89, p. 503-512, 2002.

HERBERS, K.; MEUWLY, P.; FROMMER, W. B.; METRAUX, J. P.; SONNEWALD, U. **Systemic acquired resistance mediated by the ectopic expression of invertase: possible hexose sensing in the secretory pathway**. 1996. p.

HIJWEGNWN, T.; VERHAAR, M. A.; ZADOKS, J. C. Resistance to *Sphaerotheca pannosa* in roses induced by 2,6-dichloroisonicotinic acid. **Plant Pathology**, v. 45, p. 632-635, 1996.

HU, X.; REDDY, A. S. N.; HU, X. Cloning and expression of a PR5-like protein from Arabidopsis: inhibition of fungal growth by bacterially expressed protein. **Plant Molecular Biology**, v. 34, p. 949-959, 1997.

IBGE. Tomate: Produtividade de 2011. 2011. Disponível em: <
<http://www.sidra.ibge.gov.br>. >. Acesso em: 06 de abril 2013.

IMPROCROP. 2012. Disponível em: <
http://www.improcrop.com.br/improcrop/pt/produtos_protecao_agro_mos.cfm >. Acesso em: 28 de março de 2013.

JACKSON, T. J.; BURGESS, T.; COLQUHOUN, I.; HARDY, G. E. Action of the fungicide phosphite on *Eucalyptus marginata* inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. **Plant Pathology**, v. 49, p. 147-154, 2000.

JALALI, B. L.; S., B.; KAMBLE, A. Signal transduction and transcriptional regulation of plant defence responses. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 154, p. 65-74, 2006.

JEUN, Y. C.; BUCHENAUER, H. Infection structures and localization of the pathogenesis-related protein AP24 in leaves of tomato plants exhibiting systemic acquired resistance against *Phytophthora infestans* after pre-treatment with 3-aminobutyric acid or tobacco necrosis virus. **Journal of Phytopathology**, v. 149, p. 141-153, 2001.

JONES, J. P. Fusarium wilt. In: JONES, J. B.; JONES, J. P., *et al* (Ed.). **Compendium of tomato disease**. St. Paul: APS Press, 1991. p.15.

JONES, J. P.; WOLTZ, S. S. Fusarium-incited diseases of tomato and potato and their control. In: PE, N.; TA, T., *et al* (Ed.). **Fusarium: Diseases, Biology, and Taxonomy**. Pennsylvania: Pennsylvania State University Press, 1981. p.157-168.

JULIATTI, F. C. Manejo integrado de fungos fitopatogênicos. In: SILVA, L. H. C. P.; CAMPOS, J. R., *et al* (Ed.). **Manejo Integrado: Doenças e Pragas em Hortaliças**. Lavras: UFLA, 2001. p.178.

JUNG, W. J.; JIN, Y. L.; KIM, Y. L.; KIM, Y. C.; KIM, K. Y.; PARK, R. D.; KIM, T. H. Inoculation of *Paenibacillus illinoisensis* alleviates root mortality, activates of lignification related enzymes, and induction of the isoenzymes in pepper plants infected by *Phytophthora capsici*. **Biological Control**, Orlando, v. 30, p. 645-652, 2004.

KATAN, T.; BERLINER, R.; KATAN, J. Vegetative compatibility in populations of *Fusarium oxysporum* from wild carnation. **Mycological Research**, Londres, v. 98, n. 12, p. 1415-1418, 1994.

KAWANO, T.; MUTO, S. Mechanism of Peroxidase actions for salicylic acid-induced generation of active oxygen species and an increase in cytosolic calcium in tobacco cell suspension culture. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, p. 685-693, 2000.

KEEN, N. T.; YOSHIKAWA, M. 1,3-Endoglucanase from soybean releases elicitor-active carbohydrates from fungus cell walls. **Plant Physiol.**, v. 71, p. 460-465, 1983.

KLESSIG, D. F.; MALAMY, J. The salicylic acid signal in plants. **Plant Molecular Biology**, v. 26, p. 1439-1458, 1994.

KLOPPER, J. W. Host specificity in microbe-microbe interactions. **BioScience**, v. 46, p. 406-409, 1996.

KRISTENSEN, B. K.; BLOCH, H.; RASMUSSEN, S. K. Barley coleoptile peroxidases. Purification, molecular cloning and induction by pathogens. **Plant Physiology**, Rockville, v. 120, p. 501-512, 1999.

KUC, J. Increasing crop productivity and value by increasing disease resistance through non-genetic techniques. Proceedings of a Symposium on Forest Potentials: Productivity and Value, 1985. Weyerhaeuser Co, Tacoma, Washington. p.147-190.

KUC, J. Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. **European Journal of Plant Pathology**, v. 107, p. 7-12, 2001.

KUROSAKI, F.; AMIN, M.; NISHI, A. Induction of phytoalexin production and accumulation of phenolic compounds in cultured carrot cells. **Physiologic Molecular Plant Pathology**, v. 28, p. 359-370, 1986.

KUROSAWA, C.; PAVAN, M. A. Doenças do Tomateiro. In: KIMATI, H. A., L.; BERGAMIN FILHO, A., *et al* (Ed.). **Manual de Fitopatologia: Doenças de Plantas Cultivadas**. 3 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, 1997. p.690-719.

LEON-KLOOSTERZIEL, K. M.; VERHAGEN, B. W. M.; KEURENTJES, J. J. B.; VANPELT, J. A.; REP, M.; VAN LOON, L. C.; PIETERSE, C. M. J. Colonization of the *Arabidopsis rhizosphere* by fluorescent *Pseudomonas* spp. activates a root-specific, ethylene-responsive PR-5 gene in the vascular bundle. **Plant Molecular Biology**, v. 57, p. 731-748, 2005.

LÉON, J.; LAWTON, M. A.; RASKIN, I. Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. **Plant Physiology**, Rockville, v. 108, p. 1673-1678, 1995.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The *Fusarium* laboratory manual**. Ames: Blackwell, 2006. 388p.

LOPES, C. Introdução geral. In: LOPES, C. A. e ÁVILA, A. C. (Ed.). **Doenças do Tomateiro**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2005. p.11-15.

LOPES, C. A.; SANTOS, J. R. M. **Doenças do tomateiro**. Brasília: EMBRAPA-CNPQ/SPI, 1994. p.

LOPEZ, A. M. Q.; LUCAS, J. A. Effects of plant defence activators on anthracnose disease of cashew. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, p. 409-420, 2002.

LYNCH, J.; BROW, K. M. Ethylene and plant responses to nutritional stress. **Physiologia Plantarum**, v. 100, n. 3, p. 613-619, 1997.

MACAGNAN, D.; ROMEIRO, R. S.; BARACAT-PEREIRA, M. C.; LANNA-FILHO, R.; BATISTA, G. S.; POMELLA, A. W. V. Atividade de enzimas associadas ao estado de indução em mudas de cacaueiro expostas a dois actinomicetos residentes de filoplano. **Summa Phytopathologica**, v. 34, p. 34-37, 2008.

MACHEIX, J. J.; FLEURIET, A.; QUESSADA, M. P. Involvement of phenols and peroxidases in wound healing and grafting. In: GREPPIN, H.; PENEL, C., *et al* (Ed.). **Molecular and physiological aspects of plant peroxidases**. Geneva: University of Geneva, 1986. p.267-286.

MALECK, K.; LEVINE, A.; EULGEM, T.; MORGAN, A.; SCHMID, J.; LAWTON, K. A.; DANGL, J. L.; DIETRICH, R. A. The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. **Nature Genetics**, v. 26, p. 403–410, 2000.

MARTINEZ, C.; BACCOU, J. C.; BRESSON, E.; BAISSAC, Y.; DANIEL, J. F.; JALLOUL, A.; MONTILLET, J. L.; GEIGER, J. P.; ASSIGBETSÉ, K.; NICOLE, M. Salicylic acid mediated by the oxidative burst is a key molecule in local and systemic responses of cotton challenged by an avirulent race of *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 122, p. 757-766, 2000.

MATHUR, N. K.; NARANG, C. K. Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. **Journal of Chemical Education**, v. 67, p. 938-942, 1990.

MAZARO, S. M. **Indução de resistência à doenças em morangueiro pelo uso de elicitores**. 2007. 105p. Tese (Doutorado na área de Produção Vegetal). Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

MCDONALD, A. E.; GRANT, B. R.; PLAXTON, W. C. Phosphite (phosphorous acid): its relevance in the environment and agriculture and influence on plant phosphate starvation response. **Journal of Plant Nutrition**, v. 24, p. 1505-1519, 2001.

MOHAMMADI, M.; KAZEMI, H. Changes in peroxidase and polyphenol oxidases activities in susceptible and resistance wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. **Plant Science**, Amsterdã, v. 162, p. 491-498, 2002.

NAGARAJKUMAR, M.; BHASKARAN, R.; VELAZHAHAN, R. Involvement of secondary metabolites and extracellular lytic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* in inhibition of *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen. **Microbiological Research**, v. 159, p. 73-81, 2004.

NELSON, P. E. Life cycle and epidemiology *Fusarium oxysporum*. In: MACE, M. E.; BELL, A. A., *et al* (Ed.). **Fungal wilt diseases of plants**. New York: Academic Press, 1981. p.51-80.

NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A.; MARASAS, W. F. O. **Fusarium species: an illustrated manual for identification**. University Park: The Pennsylvania State University Press, 1983. 193p.

NEUENSCHWANDER, U.; FRIEDRICH, L.; DELANEY, T.; VERNOOIJ, B.; KESSMANN, H.; RYALS, J. Activation of plant disease resistance. **Aspects of Applied Biology**, v. 42, p. 217-225, 1995.

PASCHOLATI, S. F. Indução de resistência sistêmica: opção para o controle de doenças de plantas no século XXI. **Summa Phytopathologica**, v. 29, p. 115-16, 2003.

PERALTA, I. E.; SPOONER, D. M. Classification of wild tomatoes: a review. **Kurtziana**, Córdoba, v. 28, n. 1, p. 45-54, 2000.

PONSTEIN, A. S.; BRES VLOEMANS, S. A.; SELA BUURLAGE, M. B.; ELZEN, P. J. M. V. D.; MELCHERS, L. S.; CORNELISSEN, B. J. C.; VAN DEN ELZEN, P. J. M. A novel pathogen- and woundinducible tobacco (*Nicotiana tabacum*) protein with antifungal activity. **Plant Physiology**, v. 104, p. 109-118, 1994.

REIS, A.; LOPES, C. A. Principais fungos de solo em hortaliças: epidemiologia e manejo. In: ZAMBOLIM, L. E. A. (Ed.). **Manejo integrado de doenças e pragas: hortaliças**. Viçosa: Editora UFV, 2007. p.189-191.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 2, p. 123-130, 2003.

RODRIGUES, A. A. C.; NETO, E. B.; COELHO, R. S. B. Indução de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *Tracheiphilum* em caupi: eficiência de indutores abióticos e atividade enzimática elicitada. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 492-499, 2006.

ROMEIRO, R. S.; GARCIA, F. A. O. Indução de Resistência em Plantas a Patógenos por Elicidores de Natureza Bacteriana. In: BETTIOL, W. (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Editora Embrapa Meio Ambiente, 2009. p.85-99.

RYALS, J. A.; NEUENSCHWANDER, U. H.; WILLITS, M. G.; MOLIN, A.; H.Y., S.; HUNT, M. D. Systemic acquired resistance. **Plant Cell**, v. 8, p. 1809-1819, 1996.

SBALCHEIRO, C. C. **Ação do biocontrolador com atividade de indução de resistência no controle do cretamento bacteriano comum do feijoeiro (*phaseolus vulgaris* L.)**. 2006. 124 Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo.

SCHALLER, F. Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid derived signaling molecules. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 11-23, 2001.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; BONALDO, S. M. Uso de Extratos Vegetais e Cogumelos na Indução de Resistência de PLantas a Patógenos. In: RODRIGUES, F. D. A.; FORTUNATO, A. A., *et al* (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos**. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora LTDA., 2012. p.9-28.

SILVA, R. F.; S.F., P.; BEBENDO, I. P. Indução de Resistência em Tomateiro por Extratos Aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 3, p. 189-196, 2007.

SOBRINHO, C. A.; FERREIRA, P. T. O.; CAVALCANTI, L. S. Indutores Abióticos. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M., *et al* (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenose insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p.51-80.

STADNIK, M. J.; FREITAS, M. B. Polissacarídeos Algais: Fonte de Indutores de Resistência de Plantas. In: RODRIGUES, F. D. A.; FORTUNATO, A. A., *et al* (Ed.).

Indução de resistência em plantas a patógenos. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora LTDA., 2012. p.29-50.

STADNIK, M. J.; PAULERT, R. Uso de macroalgas marinhas na agricultura. XI Congresso Brasileiro de Ficologia/ Simpósio Latino-americano sobre algas nocivas., 2008. Rio de Janeiro RJ. Museu Nacional do Rio de Janeiro. p.267-279.

STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Proteção de plântulas de milho pipoca contra *Exserohilum turcicum* pelo uso de *Saccharomyces cerevisiae*. **Summa Phytopathologica**, v. 20, p. 16-21, 1994.

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

TERRY, L. A.; JOYCE, D. C. Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 32, p. 1-13, 2004.

THIPYAPONG, P.; HUNT, M. D.; STEFFENS, J. C. Antisense downregulation of polyphenoloxidase results in enhanced disease susceptibility. **Planta**, Berlim, v. 220, p. 105-117, 2004.

VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L.; PAUL, P. A.; COSTA, H. Doenças causadas por fungos em tomate. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R., *et al* (Ed.). **Controle de doenças de plantas: hortaliças**. Viçosa: Editora UFV, 2000. p.699-756.

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

VAN LOON, L. C. The induction of pathogenesis-related proteins by pathogens and specific chemicals. **Neth. J. Plant Pathol.**, v. 89, p. 265-273, 1983.

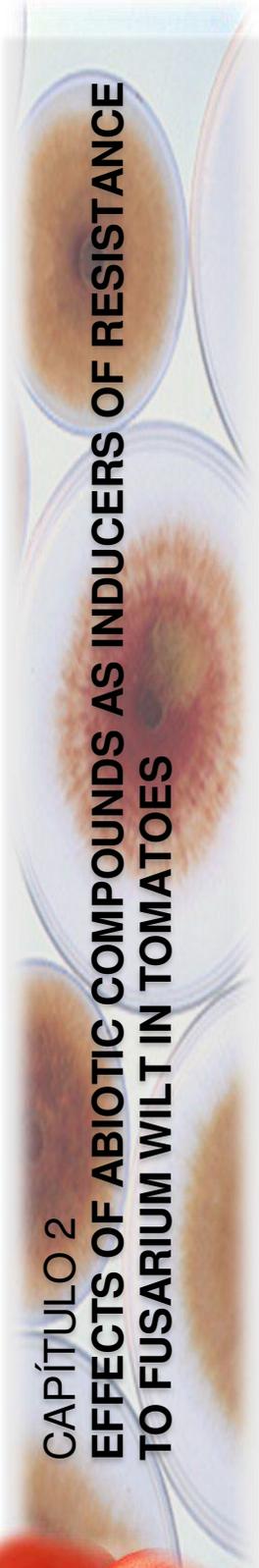
VAUGHN, K. C.; LAX, A. R.; DUKE, S. O. Polyphenol oxidase: the chloroplast oxidase with no established function. **Physiologia Plantarum**, v. 72, p. 659-665, 1988.

VERBENE, M. C.; VERPOORTE, R.; BOL, J. F.; MERCADO-BLANCO, J.; LINTHORST, H. J. M. Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance. **Nature Biotechnology**, New York, v. 18, p. 779-783, 2000.

VIGO-SCHULTZ, S. C.; STANGARLIN, J. R.; FRANZENER, G.; PORTZ, R. L.; O.J., K.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Avaliação da eficácia da tintura etanólica de guaco (*Mikania glomerata*) no controle da podridão negra (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) em couve-flor. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 27, p. 515-524, 2006.



CAPÍTULO 2
EFFECTS OF ABIOTIC COMPOUNDS AS INDUCERS OF RESISTANCE
TO FUSARIUM WILT IN TOMATOES



**EFFECTS OF ABIOTIC COMPOUNDS AS INDUCERS OF RESISTANCE TO
FUSARIUM WILT IN TOMATOES**

José R. M. Campos Neto^{1,2}; Carla F. B Cavallari³, Leonardo de Jesus M. G. de Oliveira²,
Nathália B. Diniz², Antônia Alice C. Rodrigues^{1,2}

¹Programa de Pós-graduação em Agroecologia; ²Laboratório de Fitopatologia – UEMA, ³
Bolsista PNPd. Universidade Estadual do Maranhão, Cx. Postal 09, CEP: 65054-970, São
Luís Maranhão, e-mail: aacrodriques@bol.com.br; aacrodriques@outlook.com;
munizneto@msn.com

Autor para correspondência: Antônia Alice Costa Rodrigues e-mail: aacrodriques@bol.com.br

Campos Neto JRM, Rodrigues AAC, Diniz NB, Oliveira LDJMGDO (2013) EFFECTS OF
ABIOTIC COMPOUNDS AS INDUCERS OF RESISTANCE TO FUSARIUM WILT IN
TOMATOES. Tropical Plant Pathology.

1 **ABSTRACT**

2 To study the effects of resistance inducers used to control fusarium wilt in tomatoes due
3 to the fungus *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *lycopersici*, we evaluated the effects of
4 ASM (acibenzolar-S-methyl), Agro-Mos, chitosan, Biopirrol and neem oil on *F. oxysporum* f.
5 sp. *lycopersici* mycelial growth and sporulation and systemic resistance in tomatoes. In vitro
6 experiments comprised evaluations of the products' effects on the mycelial growth and
7 sporulation of the PDA (potato dextrose agar) growth medium-cultured pathogen. In vivo
8 experiments included product application to plants of the Santa Cruz variety that were grown
9 for 25 days on autoclaved soil, followed by determinations of disease severity and peroxidase,
10 polyphenol oxidase and β -1,3-glucanase enzyme activity levels, which are related to the
11 process of resistance induction. Pathogen inoculation occurred after 5 days at a concentration
12 of 10⁶ conidia/mL. We evaluated the disease according to a rating scale. Enzymatic activity
13 was determined according to specific protocols. We used a completely randomized design.
14 Neem oil controlled pathogen mycelial growth and sporulation, while ASM influenced
15 sporulation. The products reduced the severity of wilt in the plants. We highlight neem oil,
16 Agro-Mos and Biopirrol due to their ability to induce significant peroxidase, polyphenol
17 oxidase and β -1,3-glucanase expression, respectively.

18

19 Keywords: *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *lycopersici* *Solanum lycopersicum* L.,
20 polyphenol oxidase, peroxidase, β -1,3-glucanase

21 **RESUMO**

22

23 Com o objetivo de estudar o efeito de indutores de resistência para o controle da
24 fusariose do tomateiro, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *lycopersici*,
25 avaliou-se os produtos ASM, Agro-Mos, Quitosana, Biopiról e óleo de Nim sobre
26 crescimento micelial e esporulação de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* e sobre a expressão de
27 resistência sistêmica no tomateiro. Os experimentos “*in vitro*” consistiram da avaliação do
28 efeito dos produtos sobre o crescimento micelial e a esporulação do patógeno cultivado em
29 meio de cultura BDA. Os experimentos “*in vivo*” ocorreram pela aplicação dos produtos em
30 plantas da variedade Santa Cruz, cultivadas à 25 dias em solo autoclavado, determinando-se a
31 severidade da doença e a atividade de peroxidase, polifenoloxidase e β -1,3-glucanase,
32 enzimas relacionadas ao processo de indução de resistência. A inoculação do patógeno
33 ocorreu após cinco dias na concentração de 10^6 conídios/mL. Avaliou-se a doença com base
34 em escala de notas. As atividades enzimáticas foram determinadas segundo protocolos
35 específicos. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado. O produto óleo de Nim
36 controlou o crescimento micelial e esporulação do patógeno, enquanto que o ASM
37 influenciou na esporulação. Os produtos promoveram redução da severidade da fusariose nas
38 plantas. Destaque ao óleo de Nim, Agro-Mos e Biopiról pela expressão significativa de
39 peroxidase, polifenoloxidase e β -1,3-glucanase, respectivamente.

40

41 Palavras-chave: *Solanum lycopersicum* L., polifenoloxidase, peroxidase, β -1,3-glucanase,
42 fusariose

43 INTRODUCTION

44 The tomato (*Solanum lycopersicum* L.) originated in the Andean area of South
45 America and belongs to the Solanaceae family. It is widespread in Brazil and has great
46 commercial importance for both fresh consumption and industrialization. The fresh fruit has a
47 low caloric value, a low dry matter content and high levels of calcium and vitamin C
48 (Alvarenga, 2004). This culture is of great economic importance to Brazil, as are other
49 vegetable crops of the same family (Melo & Vilela, 2004); the tomato is the second-most
50 widely grown vegetable crop in the country (Camargo Filho & Oliveira, 2012).

51 Brazil stands out as a leading tomato producer with an estimated annual production of
52 more than 4 million tons. The state of Maranhão is the sixth-most productive state in the
53 Northeastern region and produces slightly more than 4,700 tonnes from 228 planted hectares
54 (Ibge, 2011). All of this productive potential is subject to the occurrence of various diseases
55 that are influenced by several factors such as climate, the planted cultivar and seed quality,
56 among others, particularly the lack of effective measures for pathogen control.

57 Fusarium wilt stands out among the diseases that cause great losses in tomatoes. This
58 disease is caused by the fungus *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *lycopersici* Snyder &
59 Hansen and occurs in all Brazilian states, where it significantly damages crop plants and leads
60 to the premature death or destruction of all plants (Juliatti, 2001).

61 Maranhão is deficient in the control of this disease, which is associated with
62 environmental conditions favorable to the fungus, leading to constant economic unfeasibility
63 of tomato cultivation, mainly for family farms that lack the resources and techniques relevant
64 to better disease management. This situation increases production costs and significantly
65 decreases the population's access to this highly consumed product.

66 Systemic acquired resistance (SAR) might be a viable alternative in the control of
67 fusarium wilt in tomatoes. SAR results from the activation of the plant defense system in

68 response to biotic and abiotic stimuli and leads to the expression of mechanisms related to the
69 production of substances toxic to the pathogen and/or the formation of structural barriers that
70 restrict tissue colonization (Kuc, 2001). SAR comprises a complex phenomenon that involves
71 the activation of several processes, including hypersensitivity, structural barriers, the
72 increased synthesis of phytoalexins and the accumulation of pathogenesis-related proteins
73 (PRs) such as hydrolase beta-1,3-glucanase, which breaks down fungal pathogen cell walls
74 (Hammerschmidt, 1999).

75 The enzymatic changes can be related to physiological aspects in combination with the
76 induction of the plant's resistance to diseases. Several reports have demonstrated a
77 relationship between induced systemic resistance and enzymes such as peroxidase,
78 polyphenol oxidase, phenylalanine ammonia lyase, β -1,3-glucanase and chitinase (Van Loon
79 et al., 1998).

80 The use of resistance inducers in plant disease control, including the application of both
81 abiotic products and non-virulent *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* isolates, has shown success
82 in the control of tomato fusarium wilt (Aimé et al., 2008; Farag Hanaa et al., 2011).

83 With the aim of validating alternatives to the situation in which the state of Maranhão
84 finds itself relative to tomato production, we sought to evaluate resistance induction as a
85 control method capable of reducing or inhibiting the *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*
86 population by evaluating the effects of abiotic products on the pathogen and the activities of
87 enzymes involved in tomato defenses against this pathogen.

88

89

90

91

92 MATERIALS AND METHODS

93

94 *Experimental location and procurement of the Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici isolate*

95

96 The experiments were performed at the Laboratory of Phytopathology and in the
97 Greenhouse at the State University of Maranhão (Universidade Estadual do Maranhão
98 (UEMA)).

99 We used the *F. oxysporum f. sp. lycopersici* isolate “FOL 88”, which was donated by
100 Embrapa Vegetables (Embrapa Hortaliças, Brasília, DF, Brazil). The isolate was transferred
101 to Petri dishes that contained potato dextrose agar (PDA) growth medium and were later
102 transferred to test tubes to preserve pure cultures.

103 Inoculations was performed on 30-day-old tomato plants of the Santa Cruz cultivar,
104 according to the root injury method, on 1 side of the system, followed by the application of 20
105 mL of inoculum suspension at a concentration of 1×10^6 conidia/mL. Evaluations were
106 performed through fusarium wilt development to confirm pathogenicity.

107

108 *Effect of abiotic products Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici on mycelial growth and* 109 *sporulation in vitro*

110

111 Commercial products were used at different concentrations: ASM (acibenzolar-S-
112 methyl) (0.005, 0.01, 0.02 and 0.04 mg/mL), chitosan (0.15, 0.2, 0.3 and 0.5 mg/mL),
113 Biopirrol (0.25, 0.5, 1.0 and 2.0 mL/mL), Agro-Mos (0.25, 0.5, 1.0 and 2.0 mL/L) and neem
114 oil (1000, 2000, 3000 and 4000 μ L/L). The products were added to melted PDA medium
115 (approximately 45 °C) at different concentrations. Petri dishes that contained only PDA
116 without the products served as controls.

117 A 5-mm diameter disc that contained *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* mycelia (taken
118 from a colony with 7 days in PDA) was transferred to the center of each plate that contained
119 inductors, and the plates were maintained at 25 °C with a 12-hour photoperiod. Evaluations
120 were performed daily until the control plate colonization nearly reached the full plate diameter
121 (9.0 cm.) We performed measurements with a ruler in 2 diametrically opposed directions to
122 take an average measurement of the colonies. The mycelial growth inhibition percentage
123 value (GIP) was calculated as follows (Menten et al., 1976).

$$124 \quad \text{GIP} = \frac{\text{Control Growth} - \text{Treatment Growth}}{\text{Control Growth}} \times 100$$

126 The experimental design was completely randomized in a factorial scheme, 5 x 4 + 1 (5
127 treatments x 4 concentrations + 1 control), with 5 repetitions for each treatment; each
128 repetition was a Petri dish. The control characterized the null or zero concentration for all
129 treatments that were submitted to regression analysis.

130 The mycelial GIP was calculated for each dose against the control. Data were analyzed
131 in an analysis of variance in addition to a regression analysis.

132 The sporulation inhibition test was performed at the end of the mycelial growth
133 inhibition test to evaluate the level of sporulation on each of the used plates. Specifically, a
134 spore suspension was prepared by adding 10 mL of distilled water to the plate and scraping
135 the colonies with a glass slide. In this way, we determined the number of spores/mL with a
136 Neubauer chamber and an optical microscope. The number of spores/cm² was later
137 determined from the results of the mycelial growth test. Percentage data for sporulation
138 inhibition were assessed by analysis of variance and Tukey's test.

139

140 *Use of inductors in Fusarium wilt control in tomatoes*

141

142 To test the effects of inducers on the tomato plants, we used the recommended
143 concentrations of the commercial products as follows: ASM, 5.0 mg/ml; Agro-Mos®, 1.5
144 mL/L; neem oil, 2.0 mL/L; chitosan, 2.0 mg.mL⁻¹ and Biopirrol® 1.5 mL/L.

145 The Santa Cruz cultivar tomato seedlings were produced and, 15 days after sowing,
146 the plants were transplanted into 5-L pots that contained autoclaved soil and manure at a
147 density of 3 plants/pot.

148 The tested resistance inducers were applied to the plants 5 days before pathogen
149 inoculation and 25 days after sowing by spraying the first pair of leaves.

150 The inoculation was performed 30 days after sowing by root injury, and 20 ml/plant of
151 the inoculum suspension was applied to the region close to the roots at a concentration of 1 x
152 10⁶ conidia/mL. The tomato plants were kept in a greenhouse until the end of the evaluation.

153 Disease severity assessments were performed 25 days after inoculation according to a
154 grading scale proposed by Santos (1999): grade 1 was assigned to healthy plants, grade 2 to
155 sick plants with mild vascular symptoms, grade 3 to plants with symptoms of leaf yellowing
156 and vascular darkening, grade 4 to plants with severe wilt associated with vascular darkening,
157 leaf chlorosis and necrosis and grade 5 to dead plants.

158

159 *Evaluation of biochemical compounds involved in the induction process*

160

161 Total protein extraction

162

163 Leaf collection for enzyme activity preparations occurred at 5 and 10 days after
164 pathogen inoculation, with 1 plant used per collection period.

165 Briefly, 1.0-g samples of leaves that corresponded to each treatment were macerated in
166 a mortar with liquid nitrogen and 1 % (v/v) polyvinylpyrrolidone (PVP), 5 mL of sodium

167 acetate buffer (0.1 M, pH 5) and 1 mL of EDTA (1 mM). The extracts were centrifuged at
168 10,000 g for 10 minutes at 4 °C, and the supernatants were transferred to 2-mL Eppendorf
169 tubes and stored at -80 °C. The enzyme extracts were used to determine the activities of
170 peroxidases, polyphenol oxidases and β -1,3-glucanase.

171 A completely randomized experimental design was used to evaluate subdivided
172 parcels with 6 (treatments) x 2 (collection period) x 7 (repetitions); each repetition was
173 represented by 3 plants per pot. Data were submitted to an analysis of variance, and the
174 averages were compared with Tukey's test.

175

176 Peroxidase activity (E.C. 1.11.1.7)

177

178 Peroxidase activity estimations was performed according to an absorbance evaluation
179 of the oxidation of guaiacol in the presence of hydrogen peroxide, defined as the variation in
180 absorbance at 470 nm produced in the reaction medium per the time in minutes and
181 milligrams of protein (Δ Abs/min.mg). To develop the reactions, 50 μ L of guaiacol (0.02 M),
182 0.5 mL of hydrogen peroxide (0.38 M) and 2.0 mL of phosphate buffer (0.2 M/pH 5.8) were
183 transferred to a spectrophotometric cuvette. The mixture was gently stirred and used to
184 calibrate the spectrophotometer. Next, 50 μ L of the enzyme extract was added, the reaction
185 was shaken gently, and readings were performed at a wavelength of 470 nm and at intervals
186 of 10 seconds for a period of 1 minute.

187

188 Polyphenol oxidase activity (E.C. 1.10.3.1)

189

190 We added 100 μ m of enzymatic tomato leaf extract to 2.9 mL of a solution that
191 contained catechol (25 nM) dissolved in potassium phosphate buffer (100 mM, pH = 6.5).

192 The absorbance was measured at 410 nm. The specific enzyme activity was defined as the
193 variation of absorbance at 410 nm produced in the reaction medium per time in minutes and
194 milligrams of protein (Δ Abs/min.mg).

195

196 β -1,3-glucanase activity (E.C. 3.2.1.29)

197

198 The determination of β -1,3-glucanase activity was performed by measuring glucose
199 during laminarin hydrolysis (Tuzun et al., 1989). For this reaction, 25 μ L of the enzymatic
200 extract, 200 μ L of potassium acetate buffer (0.1 M, pH 4.8) and 200 μ L of laminarin (15
201 mg/mL) were pipetted into test tubes. The reactions were incubated at 37 °C for 30 minutes,
202 after which 1 ml of Somogyi reagent (Somogyi, 1952) and 10 ml of distilled-deionized water
203 were added to each and the mixtures were stirred for 10 minutes. After stirring, the reactions
204 were incubated in a water bath at 100 °C for 15 minutes and immediately cooled in an ice
205 bath. Next, 1.0 mL of Nelson reagent (Somogyi, 1952) and 25 mL of deionized-distilled water
206 were added to each reaction, followed by stirring for 15 minutes. The reactions were read
207 spectrophotometrically at 760 nm, and the readings were compared with those of glucose
208 standards. A standard curve of glucose was prepared according to the same standard addition
209 method used for the samples, with the substitution of glucose solutions for laminarin (0 - 300
210 mg/L glucose).

211

212 Determination of soluble proteins

213

214 The soluble protein concentrations were colorimetrically determined according to the
215 method described by Bradford (1976). Briefly, 200 μ l of the enzyme extract and 2 mL of
216 Coomassie Brilliant Blue (CBB) solution were pipetted into test tubes, shaken gently and read

217 spectrophotometrically at a wavelength of 595 nm. The results of the enzyme extract sample
218 readings were converted to soluble protein concentrations by comparing the readings to the
219 efficiency curve generated from the readings of standard bovine serum albumin (BSA)
220 solutions at concentrations of 0, 25, 50, 100, 150 and 200 mg/L.

221 The CBB solution was prepared by dissolving 0.10 g of CBB reagent (G-250) in 50
222 mL of absolute ethanol. Next, 100 ml of phosphoric acid (d = 1.71 g/mL) and 850 mL of
223 distilled water were added.

224

225 **RESULTS**

226

227 *Effects of abiotic products on Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici mycelial growth and*
228 *sporulation in vitro*

229

230 While evaluating the effects of the abiotic products on *F. oxysporum f. sp. lycopersici*
231 mycelial growth, a significant difference was observed between the treatments (Table 1). The
232 treatments that yielded the maximum percentages relative to the control were based on
233 chitosan, at a concentration of 0.400 mg/L and a GIP greater than 23%, and neem oil, with a
234 concentration of 4000 µL/L and a GIP greater than 17 %, compared to the control. The other
235 treatments showed mycelial growth inhibition values below 10%, which did not differ from
236 the control at a 5% level of probability, according to Tukey's test.

237 When comparing the mycelial growth curve during the 10-day examination, it was
238 noted that each inhibitor acted differentially as a function of time (Figure 1). All Agro-Mos®
239 treatments maintained their growth since the first evaluation, similar to the control, at the
240 second day after the experiment. Biopiról® and ASM treatments differed from the control on
241 the fourth day of evaluation but equaled it throughout the evaluation. Neem oil showed a

242 significant difference from the control beginning at the second day of evaluation for all
243 applied concentrations. This variation extended along the measurements, and the 1000, 2000
244 and 3000 $\mu\text{L/L}$ concentrations only equaled the control on the tenth day; the highest
245 concentration of 4000 $\mu\text{L/L}$ remained different from the control at the end of the evaluation.

246 Regarding the variations in the product concentrations, it is worth noting that only
247 neem oil and Biopirool had increasing influences in the control of the pathogen mycelial
248 growth (Figure 2), with Pearson correlation coefficients of -0.97 and -0.84, respectively, and
249 were compared to the standard inductor ASM, which did not affect the fungus as a function of
250 increased concentration (coefficient $r = 0.42$).

251 Regarding the control of conidia production, there were significant differences
252 between the treatments, both relative to the nature and to the concentrations of the employed
253 products (Table 2). We highlighted the highest concentrations of neem and ASM, which had
254 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* conidia production control percentages of 88.10 and 83.17%,
255 respectively. All concentrations of neem oil and Biopirool[®] differed from the control, with
256 sporulation control percentages ranging from 51% to 88.30% and from 51.41% to 74.23%,
257 respectively, due to increased product concentrations. Chitosan treatments did not induce
258 significant effects when compared to the control. Agro-Mos[®] and ASM induced differences
259 only at higher concentrations, with minimum concentrations of 0.5 mL/L and 0.01 mg/L,
260 respectively.

261 Figure 3 shows that ASM and neem oil caused concentration-dependent significant
262 reductions in pathogenic agent sporulation, with respective “r” correlations greater than -0.95
263 and -0.91. The other treatments showed no statistical correlations between increased
264 concentration and sporulation.

265

266 *Use of inducers in the control of tomato fusarium wilt*

267

268 When analyzing Table 3, we found a statistically significant difference at a 5%
269 probability level in Tukey's test between the application of the products and the control
270 (characterized by spraying with water). All treatments were statistically similar, with tomato
271 fusarium wilt control percentages ranging from 38.05% to 56.05%, compared to the control.

272

273 *Evaluation of biochemical compounds involved in the induction process*

274

275 Peroxidase activity (E.C. 1.11.1.7)

276

277 Figure 4 shows that at 5 days after pathogen inoculation, only the ASM-based
278 treatment differed significantly from the control, with a peroxidase activity level greater than
279 5.0 abs._{470nm}/min.mg. There was an increase in the enzyme activity at 10 days, highlighting
280 the ASM and neem oil treatments that showed increased activity, with a significant difference
281 when compared to chitosan treatment at 10 days post-inoculation with *F. oxysporum* f. sp.
282 *lycopersici*. Despite having the second-lowest average, the control did not differ from the
283 other treatments.

284

285 Polyphenol oxidase activity (E.C. 1.10.3.1)

286

287 All treatments had higher polyphenol oxidase activity than the control, except for
288 chitosan, which equaled the control treatment during the 2 evaluations (Figure 5). We
289 highlight the product Agro-Mos®, which had an enzymatic activity level greater than 7.5-
290 Δ abs._{410nm}/min.mg at 5 days post-inoculation, which differed from the other treatments, but

291 had a decreased enzyme potential at 10 days that equaled, on average, the Biopiról[®], neem oil
292 and ASM treatments after 10 days of evaluation.

293

294 β -1,3-glucanase activity (E.C. 3.2.1.29)

295

296 After 5 days of evaluation, only the ASM-based treatment differed significantly from
297 the control with a specific activity greater than 1.4 Δ abs._{760nm}/min.mg. However, the ASM and
298 neem oil treatments differed from the others at 10 days after post-inoculation, with enzymatic
299 activities greater than 1.2 Δ abs._{760nm}/min.mg (Figure 6). Another observed feature of the
300 above treatments is the difference in the enzyme efficiency over time. Notably, for the ASM-
301 based treatment, a decrease in the enzymatic activity occurred when the levels at 5 and 10
302 days post-inoculation were compared, whereas neem oil treatment increased the enzymatic
303 activity during the same period.

304

305 **DISCUSSION**

306

307 Treatments based on chitosan and neem oil at the highest concentrations inhibited
308 pathogen mycelial growth within the first evaluations (2 and 4 days after the beginning of the
309 experiment; Figure 1), demonstrating the efficiency of the products in preventing the
310 establishment of the microorganism and featuring one of the main reasons for the significant
311 differences between the treatments and the control at the highest concentrations of neem oil
312 and chitosan.

313 Cia et al. (2010) observed that even at low concentrations (0.5% chitosan on PDA
314 medium), chitosan controlled 100% of the mycelial growth of *Rhizopus stolonifer*. Faria et al.
315 (2009) observed a 30% control rate of the fungus *Botryosphaeria* sp. with different

316 concentrations of chitosan, reaffirming that variations in the product concentration positively
317 affect the control of mycelial growth of the studied fungus.

318 The products Agro-Mos®, ASM and Biopiról® did not immediately show this effect
319 against the pathogen, as demonstrated by the lower comparative variations between these
320 treatments and the control throughout the experiment. Even during the early stages of growth
321 medium colonization, the pathogen did not experience negative stimulation from the products
322 and demonstrated normal vegetative growth. These results support the use of these substances
323 as resistance inducers due to the absence of toxic effects of the inducing agent on the
324 pathogen (Steiner & Schönbeck, 1995; Romeiro & Garcia, 2009).

325 In general, regardless of the concentrations, neem, Biopiról and chitosan treatments
326 presented, in ascending order, higher controlling effects on *F. oxysporum* in the *in vitro* tests
327 (Table 1, Figure 1). Here, the qualification and quantification of the enzymes involved in
328 resistance induction is justified because the simple spatial separation between the inducer
329 application site (part area) and the pathogen inoculation site (root system) does not feature a
330 precise criterion for resistance induction because the possibility of systemic translocation of
331 the applied product as an inducer from the host application site to the pathogen infection site,
332 where it expresses antifungal effects, remains unknown or poorly studied.

333 In Figure 2, it is clear that the negative correlation between varied concentrations of
334 neem oil and Biopiról® and pathogen mycelial growth also reinforces the use of products
335 derived from *Azadirachta indica* as fungitoxic controllers that are applied directly to disease
336 symptoms in plants or preventively to the site of pathogen action (Diniz et al., 2006; Silva,
337 2010). This correlation also extends the use of Biopiról, a pyrolysis extract commonly used as
338 a foliar fertilizer and now with a fungitoxic strand, towards mainly preventing the
339 establishment of the pathogen or as a resistance inducer.

340 Even with the absence of effective pathogen control due to the fungitoxic effects of
341 increased concentrations of ASM, Agro-Mos® and chitosan (Figure 2), we cannot discard the
342 hypothesis that the inducers might act through different mechanisms in addition to resistance
343 induction, such as changes in the rhizosphere quality that could encourage microbial flora at
344 the inoculation site, even in the presence of spatial separation between induction and
345 inoculation. The evaluation of other criteria, such as the formation and activation of enzymes
346 related to pathogenicity, is extremely important in qualifying and/or quantifying the
347 occurrence of resistance induction.

348 The results of these experiments indicate that the tested products act through different
349 control mechanisms against *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* and can directly influence the area
350 covered by the pathogen and thus limit mycelial growth (Table 1) or can exert negative effects
351 on the ability of the fungus to increase its inoculum source through sporulation control (Table
352 2). However, there were significant differences in pathogen spore production for most
353 treatments, with the exception of Chitosan, which remained similar to the control. Figure 3
354 showed that the variation in sporulation was only addressed by increasing the concentrations
355 of the ASM and neem oil treatments; this result was already expected due to the referenced
356 potential fungicide abilities of *A. indica*.

357 The increased fungicidal effects of the products are essential when seeking to apply
358 products to the possible sources of inoculum to reduce the inoculum or minimize pathogen
359 spread before the environment is contaminated while accounting for the effect of the product
360 on the agroecosystem, as well as the use of integrated management practices. In pre-infested
361 environments, where the goal is to control the disease by resistance induction, such products
362 can be justified as inducers because the application occurs in the plant canopy, and even when
363 translocation of the product to the roots occurs, the inductive effects should be more
364 noticeable than simple sporulation inhibition. At that point, there is a combined effect of

365 control mechanisms, either due to resistance induction or to direct control of the causal agent,
366 in favor of better disease management.

367 The results obtained by Guzzo et al. (2001) extend beyond those obtained in this study.
368 Although the effects of ASM have been demonstrated against *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*
369 spore production, the authors observed with fluorescence microscopy that ASM, when
370 applied *in vitro*, does not interfere with spore germination and appressorium formation in
371 *Hemileia vastratrix* and concluded that ASM did not exert a direct antimicrobial action
372 against the pathogens; however, ASM induced the expression of genes for resistance to the
373 formation of compounds that would prevent or hinder the establishment or development of
374 the pathogens.

375 Systemic resistance activation was observed in the in Santa Cruz tomato cultivar, and *F.*
376 *oxysporum* f. sp. *lycopersici* was controlled by the application of inducers (Table 3). It was
377 observed that even during the early stages of the disease, represented by grades 1 and 2 of
378 scale (Santos, 1999) in which plants appear to be normal or to have mild vascular symptoms,
379 respectively, the effects of inducers on the plants could be significantly differentiated; this is
380 best demonstrated in the evaluation of enzymes involved in the resistance induction process.
381 The results of this experiment corroborate those reported by Cruz et al. (2011) , who
382 evaluated the effects of different inducers in tomato fusarium wilt severity reduction in the
383 state of Maranhão.

384 A priori, it can be inferred that the plant aroused or constituted sources of defense, a
385 hallmark of induction that was described by several authors as a state of alertness, in which
386 the plant responds with greater agility and efficiency to the establishment of the challenging
387 pathogen. For many authors, the application of resistance inducers promotes the activation of
388 SAR, leading to a marked reduction in disease symptoms (Kessmann et al., 1994b; 1994a;

389 Martinez et al., 2000) because it initially occurs in the infection region to prevent or delay the
390 entry of the pathogen (Agrios, 2005).

391 In an analysis of figure 4, it was observed that resistance induction occurred in response
392 to increasing peroxidase enzyme activation. This finding can be explained by the fact that the
393 pathogen itself is an inductive element, and thus the recognition signals induced by contact of
394 the plant with the organism can trigger latent defense mechanisms, even in smaller
395 proportions.

396 The progressive continuity of this evaluation could validate the effective difference in
397 enzyme activity increases with inducer application, relative to the control. More studies on the
398 durability of this increase in enzyme activity are required because many authors have limited
399 their evaluations to a maximum of 7 days after pathogen inoculation (Araujo & Menezes,
400 2009; Mandal et al., 2009).

401 This increase in enzyme activity reinforces the importance of resistance induction as a
402 plant defense promoter over time and might suggest the hypothesis that this is a mechanism
403 through which ASM and neem oil activate resistance in tomato plants. Peroxidase is closely
404 related to the formation of cell wall components, wherein the increased activity promotes or
405 predisposes wall thickening. In the first instance, cell wall strengthening occurs due to the
406 formation of lignin, suberin and other cell wall polysaccharides, in addition to the activity of
407 peroxidase as an antimicrobial agent that acts directly on the pathogen.

408 According to Hiraga et al. (2001) , the dehydrogenative oxidation of guaiacol results in
409 the formation of phenoxy radicals, and the subsequent binding of unstable radicals leads to the
410 non-enzymatic polymerization of monomers; similarly, hydroxycinnamyl alcohol and its
411 derivatives are converted into phenoxy radicals to form lignin, and hydroxycinnamic acid is
412 converted into suberin.

413 Araujo & Menezes (2009) observed significant differences in peroxidase activity levels
414 in response to ASM, azoxystrobin and *Bacillus subtilis* when these were used as resistance
415 inducers in tomato plants. Likewise, Mandal et al. (2009) demonstrated that peroxidase
416 activity in tomato plants sharply increased in response to the application of salicylic acid, an
417 ASM analogue, during a 168-hour (7-day) period.

418 Kühn (2007) observed an increase in peroxidase activity in IAC Carioca Tybatã bean
419 plants and a reduction in the severity of the bacterial blight common in plants treated with
420 *Bacillus cereus*.

421 It is noteworthy that there was a decrease in the potential of the enzyme polyphenol
422 oxidase over time in response to most treatments (Figure 5), which allows us to infer that the
423 action of this process is more efficient when resistance induction occurs near the onset of the
424 disease/pathogen. As much as it is possible, under controlled conditions, to set the interval
425 between induction with elicitors and the pathogen inoculation, under field conditions, where
426 inoculation is natural, it is possible to initiate induction during the phase in which the tomato
427 is more susceptible to the pathogen, with regard to the efficiency of polyphenol oxidase in
428 disease control by directly oxidizing polyphenols into quinones, which are usually toxic to the
429 challenging pathogen.

430 These results differ from those of Silva et al. (2007) , who reported lesser effects of
431 polyphenol oxidase in plants that were treated with inducers and inoculated with bacteria
432 when compared to those that were treated with the water-based control and/or inoculated with
433 the pathogen. However, these findings corroborate the results of Cavalcanti et al. (2006) , who
434 observed increasing peaks of activity for this enzyme within the first 48 hours after treatment
435 with the inductors ASM and Ecolife[®] but demonstrated a decline in the enzyme efficiency
436 from the ninth day of evaluation. Farag Hanaa et al. (2011) observed peaks for 9 polyphenol

437 oxidase isozymes at 7 days post-inoculation with *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato
438 seedlings that were treated with aqueous extracts of Neem and Melon.

439 Resistance induction in response to activation of the enzyme β -1,3-glucanase was
440 shown in all treatments (Figure 6), with emphasis given to ASM and Biopiról treatments,
441 which differed from the others at 10 days post-pathogen inoculation (Figure 6). Another
442 observed characteristic among the described treatments is the difference in the efficiency of
443 the enzyme over time. It is notable that for the ASM-based treatment, there was a decrease in
444 enzymatic activity when days 5 and 10 post-inoculation were compared, whereas Biopiról
445 treatment increased the enzymatic activity over the same period.

446 ASM has been widely studied as a potential inducer of systemic acquired resistance,
447 and increases in β -1,3-glucanase activity were demonstrated in most cases (Cole, 1999;
448 Godard et al., 1999; Resende et al., 2002; Cavalcanti et al., 2006). With the obtained results,
449 we can infer the importance of Biopiról[®] as a resistance inducer and an important elicitor of
450 β -1,3-glucanase production, an enzyme of utmost importance in plant defenses against
451 pathogen attacks that acts directly on fungal cell wall hydrolysis. Rodrigues et al. (2006)
452 found a negative correlation between the actions of inducers against enzyme activity at 5 days
453 post-inoculation and the disease index in cowpea cultivars (*Vigna unguiculata* L.), which
454 reinforces the importance of studies that aim to reduce disease severity through the use of
455 resistance inducers.

456 This study demonstrated the possibility of tomato fusarium wilt control through an
457 ecological management strategy and generated basic knowledge about biochemical aspects
458 involved in tomato plant defenses. The results also indicated that the tested products acted
459 through different mechanisms of resistance induction with regard to activated enzymes,
460 demonstrating that the use of inducer combinations is important in increasing the extent of
461 plant protection mechanisms.

462 **ACKNOWLEDGMENTS**

463

464 We thank the Foundation for Research Support and Scientific and Technological
465 Development of the State of Maranhão (Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento
466 Científico e Tecnológico do Estado do Maranhão (FAPEMA)) for supporting this research.
467 We thank Dr. Leonardo Silva Boiteux (Embrapa vegetables/Embrapa hortaliças) and doctoral
468 student Amanda Melo Gonçalves (Plant Pathology/UNB) for donating the *Fusarium*
469 *oxysporum* f. sp. *lycopersici* isolate that was used in this work.

470 **REFERENCES**

- 471
472 Agrios GN (2005) Plant pathology. 5. ed. San Diego. Elsevier Academic Press.
473
474 Aimé S, Cordier C, Alabouvette C, Olivain C (2008) Comparative analysis of PR gene
475 expression in tomato inoculated with virulent *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and the
476 biocontrol strain *F. oxysporum* Fo47. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 73:9-15.
477
478 Alvarenga MaR (2004) Origem, botânica e descrição da planta. In: Alvarenga MaR e Al. E
479 (Eds.). Tomate: produção em campo, em casa-de-vegetação e em hidroponia. Lavras. Editora
480 UFLA. pp.15-18.
481
482 Araujo FF, Menezes D (2009) Indução de resistência a doenças foliares em tomateiro por
483 indutores biótico (*Bacillus subtilis*) e Abiótico (Acibenzolar-S-Metil). *Summa*
484 *Phytopathologic*, Botucatu 35:169-172.
485
486 Bradford MA (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities
487 of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, New York
488 72:248-254.
489
490 Camargo Filho WP, Oliveira AC. Perfil da olericultura no Brasil e em São Paulo, 2011-
491 junho/2012. 2012. Available at:
492 [http://www.cati.sp.gov.br/projetolupa/estudos_lupa/Perfil_da_Olericultura_SP_2011-](http://www.cati.sp.gov.br/projetolupa/estudos_lupa/Perfil_da_Olericultura_SP_2011-2012.pdf)
493 [2012.pdf](http://www.cati.sp.gov.br/projetolupa/estudos_lupa/Perfil_da_Olericultura_SP_2011-2012.pdf). Accessed on 21 de Janeiro de 2013.
494
495 Cavalcanti FR, Resende MLV, Zacaroni AB, Ribeiro Junior PM, Costa JCB, Souza RM
496 (2006) Acibenzolar-S-metil e Ecolife® na indução de respostas de defesa do tomateiro contra
497 a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*). *Fitopatologia Brasileira*, 31:372-380.
498
499 Cia P, Benato ExA, Pascholati SF, Garcia EO (2010) Quitosana no controle pós-colheita da
500 podridão Mole em caqui 'rama forte'. *Bragantia*, Campinas 69:745-752.
501
502 Cole D (1999) The efficacy of acibenzolar-S-methyl, an inducer of systemic acquired
503 resistance, against bacterial and fungal diseases of tobacco. *Crop Protection*, 18:267-273.
504
505 Cruz SMDC, Rodrigues AaC, Coelho RSB, Sardinha DHS (2011) Ação indutora de produtos
506 abióticos na resistência de tomateiro e efeito sobre o crescimento micelial de *Fusarium*
507 *oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. *Idesia*, Chile 29:111-118.
508
509 Diniz LP, Maffia LA, Dhingra OD, Casali VWD, Santos RHS, Mizubuti ESG (2006)
510 Avaliação de produtos alternativos para controle da requeima do tomateiro. *Fitopatologia*
511 *Brasileira*, 31:171-179.
512
513 Farag Hanaa RM, Abdou ZA, Salama DA, Ibrahim MaR, Srour HaM (2011) Effect of neem
514 and willow aqueous extracts on fusarium wilt disease in tomato seedlings: Induction of
515 antioxidant defensive enzymes. *Annals of Agricultural Science*, 56:1-7.
516

- 517 Faria CMDR, Maia AJ, Botelho RV, Leite CD (2009) Influência da Quitosana no
518 Crescimento Micelial de *Botryosphaeria* sp., Agente Causal do Declínio da Videira. Revista
519 Brasileira de Agroecologia, 4
520
- 521 Godard JF, Ziadi S, Monot C, Corre DL, Silué D (1999) Benzothiadiazole (ASM) induces
522 resistance in cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) to downy mildew of crucifers
523 caused by *Peronospora parasitica*. Crop Protection, 18:397-405.
524
- 525 Guzzo SD, Castro RM, Kida K, Martins EMF (2001) Ação protetora do acibenzolar-S-methyl
526 em plantas de cafeeiro contra ferrugem. Arquivos do Instituto Biológico 89-94.
527
- 528 Hammerschmidt R (1999) Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens?
529 Physiology and Molecular Plant Pathology, 55:77-84.
530
- 531 Hiraga S, Sasaki K, Ito H, Ohashi Y, Matsui H (2001) A large family of class III plant
532 peroxidases. Plant and Cell Physiology, Tokyo 42:462-468.
533
- 534 Ibge. Tomate: Produtividade de 2011. 2011. Available at: <http://www.sidra.ibge.gov.br>.
535 Accessed on 06 de abril 2013.
536
- 537 Juliatti FC (2001) Manejo integrado de fungos fitopatogênicos. In: Silva LHCP; Campos JR,
538 *et al* (Eds.). Manejo Integrado: Doenças e Pragas em Hortaliças. Lavras. UFLA. pp.178.
539
- 540 Kessmann H, Staub T, Hofmann C, Maetzke T, Herzog J, Ward E, Uknes S, Ryals J (1994a)
541 Activation of systemic acquired disease resistance in plants. European Journal of Plant
542 Pathology, Dordrecht 100:359-369.
543
- 544 Kessmann H, Staub T, Hofmann C, Maetzke T, Herzog J, Ward E, Uknes S, Ryals J (1994b)
545 Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. Annual Review of
546 Phytopathology, Palo Alto 32:439-459.
547
- 548 Kuc J (2001) Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its
549 application. European Journal of Plant Pathology, 107:7-12.
550
- 551 Kühn OJ. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-**
552 **metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e**
553 **produção**. 2007. 140 p. Tese (Doutorado na área de Fitopatologia). Universidade de São
554 Paulo, Piracicaba.
555
- 556 Mandal S, Mallick N, Mitra A (2009) Salicylic acid-induced resistance to *Fusarium*
557 *oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato. Plant Physiology and Biochemistry, 47:642-649.
558
- 559 Martinez C, Baccou JC, Bresson E, Baissac Y, Daniel JF, Jalloul A, Montillet JL, Geiger JP,
560 Assigbetsé K, Nicole M (2000) Salicylic acid mediated by the oxidative burst is a key
561 molecule in local and systemic responses of cotton challenged by an avirulent race of
562 *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. Plant Physiology, Bethesda 122:757-766.
563
- 564 Melo PCT, Vilela NJ (2004) Desempenho da cadeia agroindustrial brasileira do tomate na
565 década de 90. Horticultura Brasileira, Brasília 22:154-160.
566

- 567 Menten JOM, Minussi CC, Castro C, Kimati H (1976) Efeito de alguns fungicidas no
568 crescimento micelial de *Macrophominia Phaseolina* (Tass.) Goid. “*in vitro*”. Fitopatologia
569 Brasileira, Brasília 1:57-66.
570
- 571 Resende MLV, Nojosa GBA, Cavalcanti LS, Aguilari MaG, Silva LHCP, Perez JO, Andrade
572 GCG, Carvalho GA, Castro RM (2002) Induction of resistance in cocoa against *Crinipellis*
573 *perniciosa* *Verticillium dahliae* by acibenzolar-S-methyl (ASM). Plant Pathology, San
574 Diego 51:621-628.
575
- 576 Rodrigues AaC, Neto EB, Coelho RSB (2006) Indução de resistência a *Fusarium oxysporum*
577 f. sp. *Tracheiphilum* em caupi: eficiência de indutores abióticos e atividade enzimática
578 elicitada. Fitopatologia Brasileira, 31:492-499.
579
- 580 Romeiro RS, Garcia FaO (2009) Indução de Resistência em Plantas a Patógenos por
581 Elicidores de Natureza Bacteriana. In: Bettiol W (Eds.). Biocontrole de doenças de plantas:
582 uso e perspectivas. Jaguariúna. Editora Embrapa Meio Ambiente. pp.85-99.
583
- 584 Santos JRM (1999) Protocolo de Tecnologia: Seleção para resistência a doenças em
585 hortaliças. N.3 Tomateiro/Murcha-de-fusario. EMBRAPA Hortaliças - Comunicado Técnico
586 11
587
- 588 Silva LS. **Efeito de extratos foliares de nim em *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* e na**
589 **intensidade do mal do Panamá em mudas de bananeira cv. maçã.** 2010. 54p. (Mestrado
590 em Produção Vegetal). Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba.
591
- 592 Silva RF, Pascholati SF, Bebendo IP (2007) Indução de Resistência em Tomateiro por
593 Extratos Aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*.
594 Fitopatologia Brasileira, 32:189-196.
595
- 596 Somogyi M (1952) Notes on sugar determination. Journal of Biology and Biochemistry,
597 195:19-23.
598
- 599 Steiner U, Schönbeck F (1995) Induced disease resistance in monocots. In: Hammerschmidt
600 R e Kuc J (Eds.). Induced Resistance to Disease in Plants (Developments in Plant Pathology).
601 Dordrech. Kluwer Academic Pub. pp.182.
602
- 603 Tuzun S, Rao NM, Vogeli U, Schardl CL, Kuc J (1989) induced systemic resistance to blue
604 mold: early induction and accumulation of β -1,3-glucanase, chitinase, and other
605 pathogenesis-related proteins (b-proteins) in immunized tobacco. Physiology and
606 Biochemistry, 79:979-983.
607
- 608 Van Loon L, Bakker P, Pieterse C (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere
609 bacteria. Annual Review Phytopathology, 36:453-483.
610
611
612

Table 1. Evaluation of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* mycelial growth inhibition in response to abiotic product application.

Treatments	Colony diameter (cm)	GIP (%)
Agro-Mos® 01	8.11 c**	1.62
Agro-Mos® 02	7.84 bc	4.85
Agro-Mos® 03	7.98 bc	3.24
Agro-Mos® 04	8.38 c	-1.72
ASM 01	8.03 bc	2.57
ASM 02	8.14 c	1.23
ASM 03	8.11 c	1.60
ASM 04	8.26 c	-0.22
Biopiról® 01	8.00 bc	2.93
Biopiról® 02	7.68 bc	6.81
Biopiról® 03	7.85 bc	4.75
Biopiról® 04	7.51 abc	8.88
Chitosan 01	8.60 c	-4.35
Chitosan 02	8.22 c	0.26
Chitosan 03	8.17 c	0.87
Chitosan 04	6.30 a	23.56
Control	8.24 c	-
Neem 01	7.97 bc	3.30

Neem 02	7.51 abc	8.88
Neem 03	7.47 abc	9.40
Neem 04	6.81 a	17.39

** Averages followed by the same letter in the column do not differ in a Tukey's test at 1% ($p < 0.01$) significance level. CV (%) = 7.79.

Table 2. Evaluation of the inhibition of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* sporulation in response to abiotic product application.

Treatments	Number of <i>Conidia</i> /mL	GIP (%)
AGRO-MOS® 01	1.20E+06 d*	17.35
AGRO-MOS® 02	7.04E+05 c	51.41
AGRO-MOS® 03	5.16E+05 abc	64.42
AGRO-MOS® 04	5.38E+05 bc	62.90
ASM 01	1.22E+06 d	15.72
ASM 02	1.18E+06 d	18.83
ASM 03	5.23E+05 abc	63.93
ASM 04	2.44E+05 ab	83.17
BIOPIROL® 01	7.04E+05 c	51.41
BIOPIROL® 02	5.24E+05 bc	63.81
BIOPIROL® 03	4.32E+05 abc	70.20
BIOPIROL® 04	3.73E+05 abc	74.23
CHITOSAN 01	1.17E+06 d	19.37
CHITOSAN 02	1.20E+06 d	17.17
CHITOSAN 03	1.13E+06 d	22.35
CHITOSAN 04	1.22E+06 d	16.01
CONTROL	1.45E+06 d	-
NEEM 01	7.10E+05 c	51.00

NEEM 02	6.52E+05 c	55.02
NEEM 03	6.03E+05 c	58.36
NEEM 04	1.70E+05 a	88.30

*Averages followed by the same letter in the column do not differ in a Tukey's test at a 5% (p < 0.05) significance level.

Table 3. “*In vivo*” *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* control in response to abiotic product application

Treatments	Grades	Control (%)
Control	2.39 a**	-
ASM	1.05 b	56.05
AGRO-MOS	1.19 b	50.19
NEEM	1.29 b	46.00
CHITOSAN	1.43 b	40.14
BIOPIROL	1.48 b	38.05

**Averages followed by the same letter in the column do not differ in a Tukey's test at a 1% ($p < 0.01$) significance level. DMS = 0.6951 and CV (%) = 29.61%.

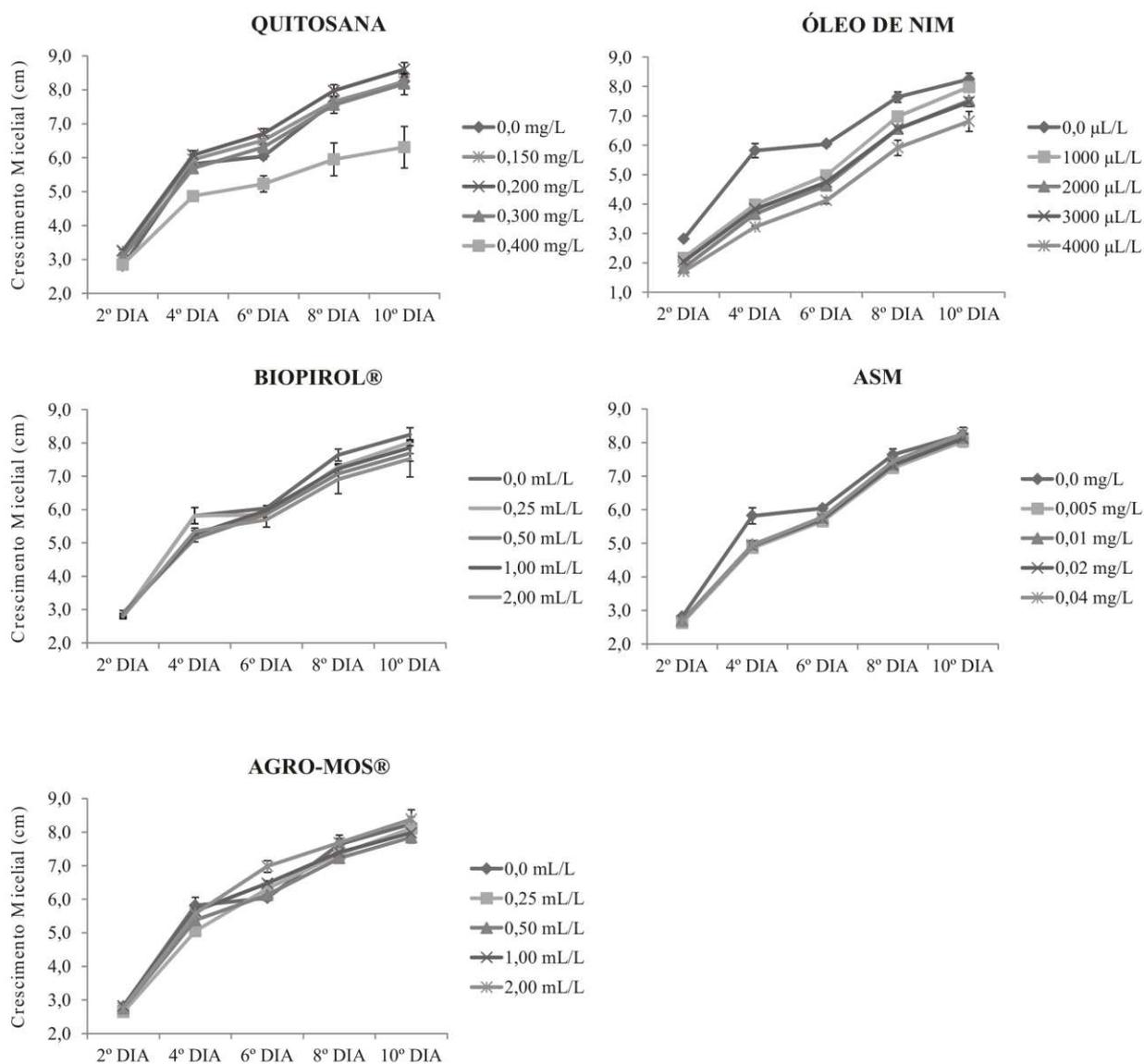


Figure 1: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* mycelial growth as a function of the nature and concentration of the inducer over a 10-day evaluation period.

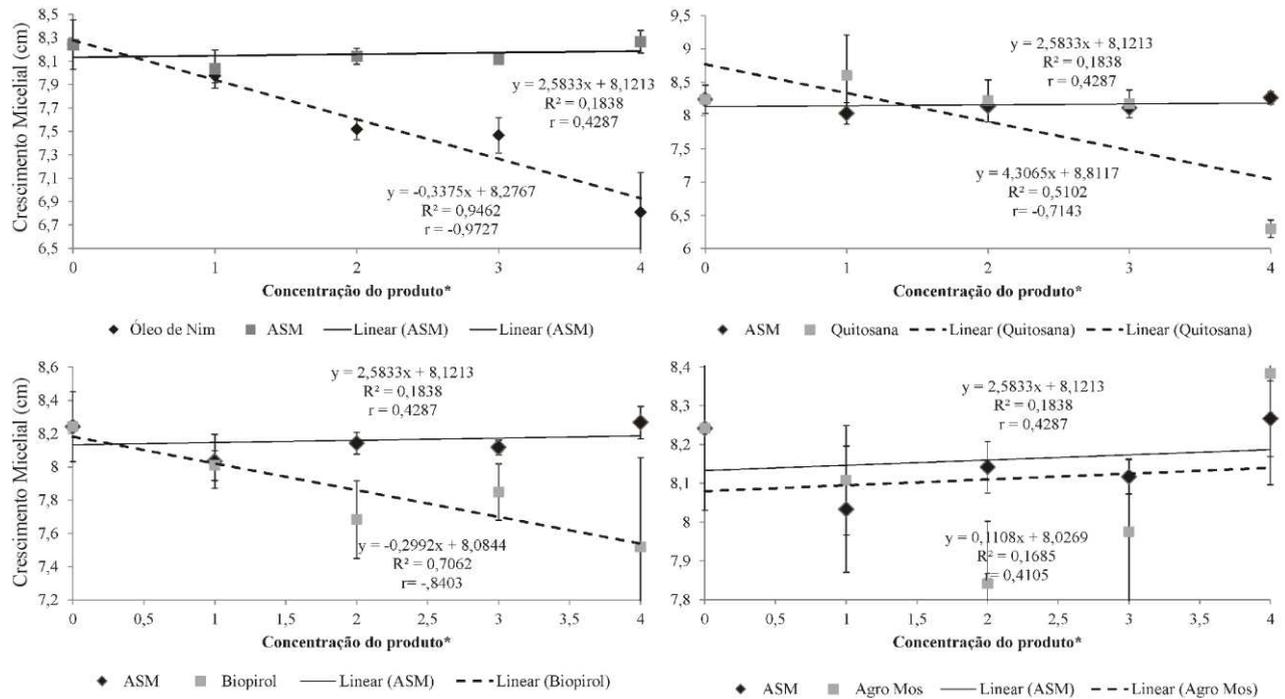


Figure 2: Linear correlation between inducer concentration and *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* mycelial growth ($P < 0.05$). * Concentrations 0, 1, 2, 3 and 4 represent: 0.0, 0.005, 0.01, 0.02 and 0.04 mg/L ASM; 0.0, 1000, 2000, 3000 and 4000 μ L/L neem oil; 0.0, 0.25, 0.5, 1.0 and 2.0 mL/L Biopiról; 0.0, 0.25, 0.5, 1.0 and 2.0 mL/L Agro-Mos®; and 0.0, 0.15, 0.2, 0.3 and 0.4 mg/L chitosan.

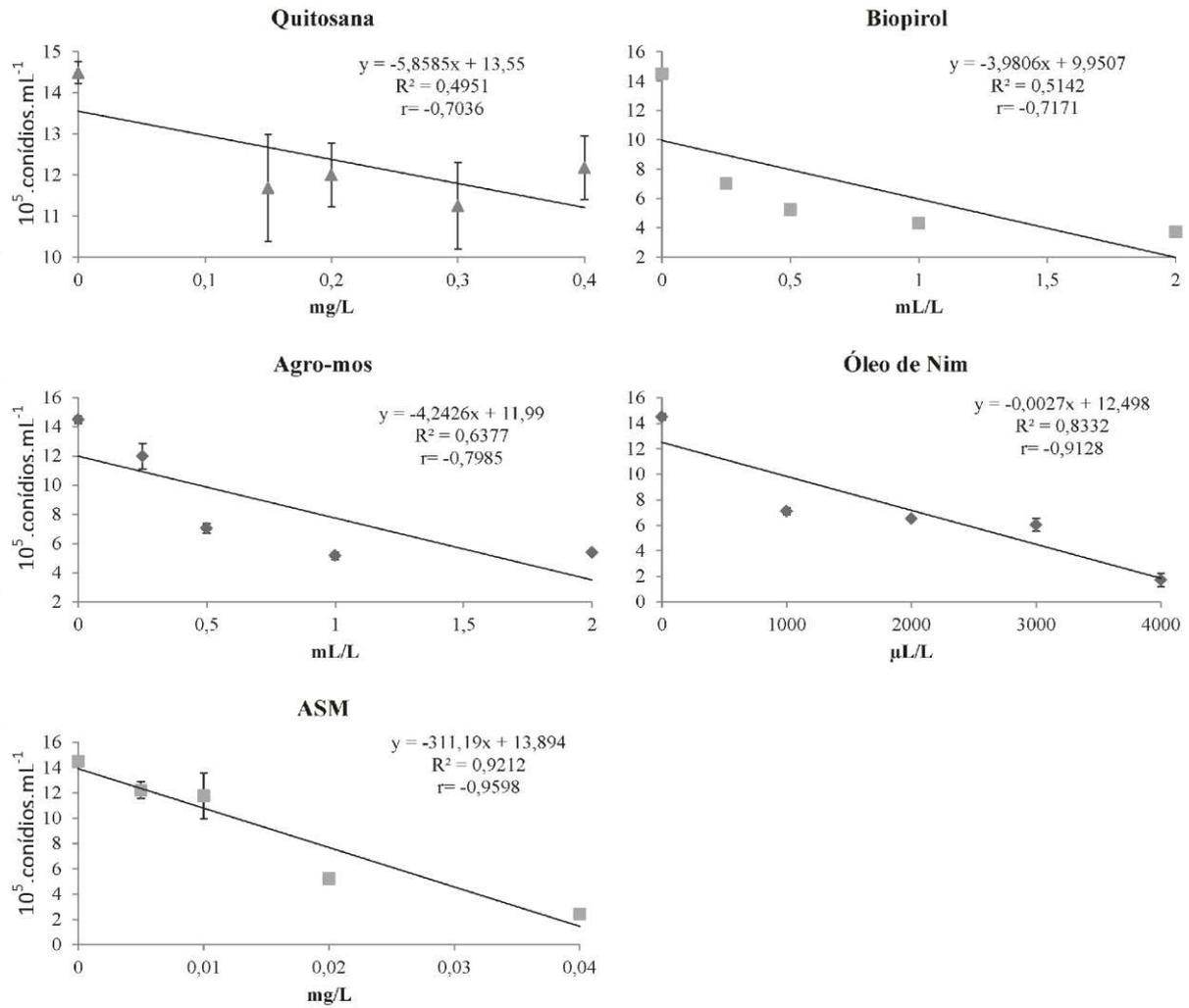


Figure 3: Linear correlation between inducer concentration and *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* sporulation ($P < 0.05$)

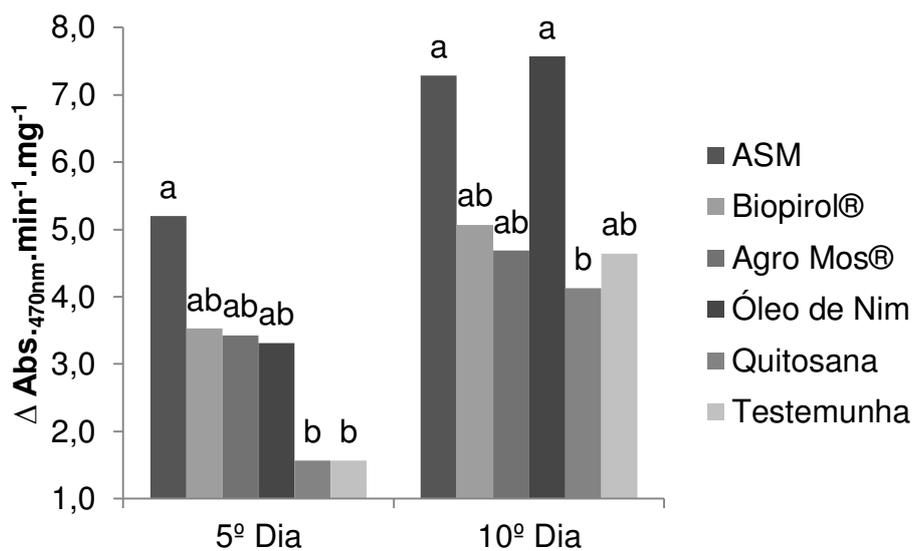


Figure 4: Hydrogen peroxide oxidation by the peroxidase enzyme in response to different resistance inducers that were applied to tomato plants. Averages followed by the same letter in the column do not differ in a Tukey's test at a 5% ($p < 0.05$) significance level.

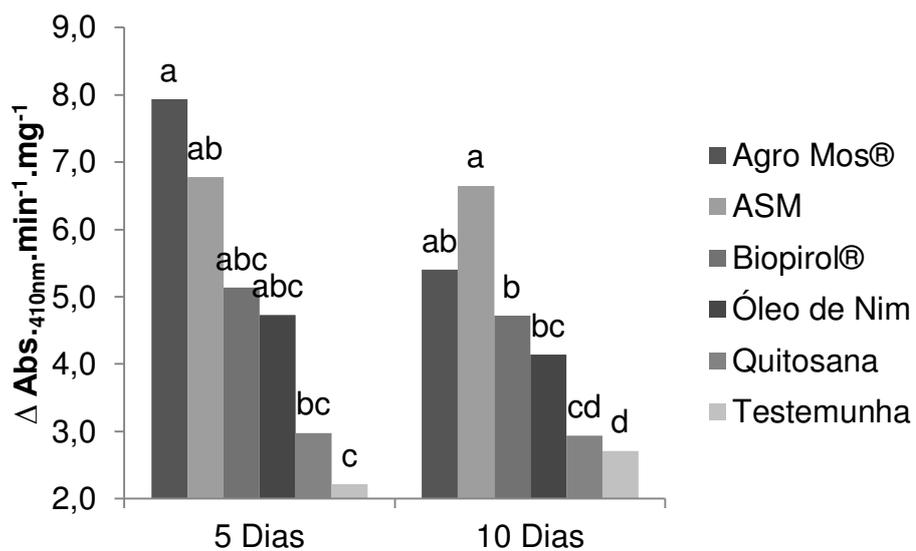


Figure 5: Abiotic product-induced polyphenol oxidase activity in tomato leaves. Means followed by the same letter in the column do not differ in a Tukey's test at a 5% ($p < 0.05$) significance level.

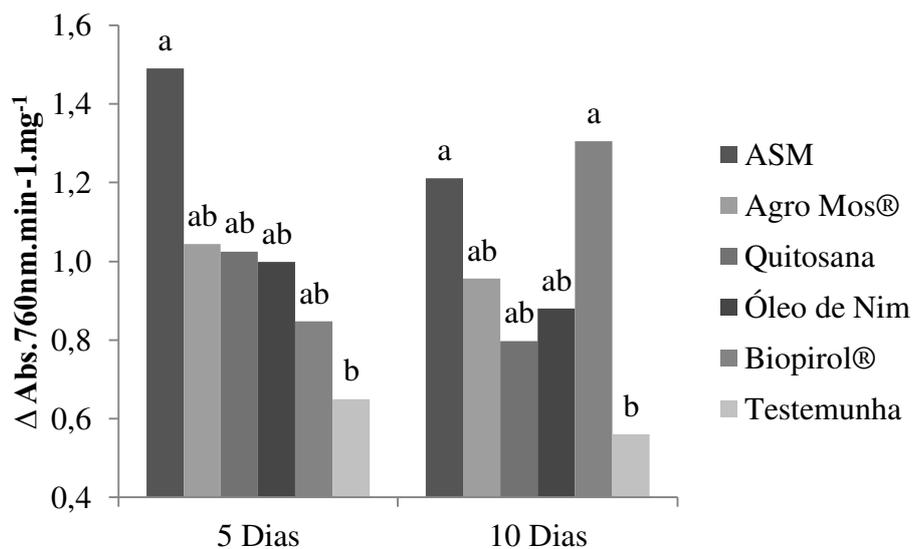


Figure 06: Abiotic product-induced β -1,3-glucanase activity in tomato leaves. Means followed by the same letter in the column do not differ in a Tukey's test at a 5% ($p < 0.05$) significance level.



CONSIDERAÇÕES FINAIS



CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente as medidas de controle sugeridas para diminuir perdas ocasionadas por essa doença são pouco eficientes e há um déficit de cultivares resistentes disponíveis no mercado. O problema ganha maior importância em função da variabilidade de raças do fungo promotoras da doença.

Este trabalho abre a possibilidade do controle da fusariose do tomateiro através de uma estratégia de manejo ecológica, gerando conhecimento básico sobre aspectos bioquímicos envolvidos na defesa do tomateiro sob condições Maranhenses.

Os resultados indicam que os produtos testados agem com diferentes mecanismos de indução de resistência em função das enzimas ativadas, mostrando que a utilização de combinações ganha importância quanto ao aumento da amplitude da proteção.

Quanto os produtos que tiravam ação sobre o patógeno, justifica-se a aplicação como indutores em ambientes pré-infestados pelo patógeno uma vez que a aplicação ocorre na parte aérea da planta e, mesmo podendo ocorrer a translocação do produto até as raízes, o efeito indutor deverá ser mais notório que a fungitoxicidade. Ocorre assim um efeito combinado dos mecanismos de controle em prol do melhor manejo da doença.



NORMAS DA REVISTA TROPICAL PLANT PATHOLOGY

Instruções aos Autores

Política editorial

Tropical Plant Pathology é uma publicação oficial da Sociedade Brasileira de Fitopatologia, mas as contribuições dos membros e não-membros da Sociedade são igualmente bem-vindas. É uma condição fundamental que os manuscritos submetidos não tenham sido e não serão publicados em nenhum outro veículo. Com a aceitação de um manuscrito para publicação, os editores adquirem direitos autorais plenos e exclusivos para todas as línguas e países. Não há nenhum custo por página, exceto ilustrações coloridas na versão impressa (R\$ 300 para cada página com uma figura colorida). Os autores podem optar por publicar a cores apenas na versão on line, sem nenhum custo. Separatas podem ser obtidas gratuitamente em formato PDF na página da TPP no portal SciELO.

Os trabalhos deverão ser escritos em inglês.

Os manuscritos serão analisados inicialmente pelos Editores, que verificarão conformidade com o escopo da revista e, então, serão atribuídos a um Editor de Seção. O Editor de Seção irá supervisionar o processo de revisão e será responsável pela decisão final. A aceitação é baseada na qualidade do trabalho, no reconhecimento de uma contribuição significativa para a fitopatologia e na apresentação geral do manuscrito.

Submissão de Manuscritos

Os manuscritos são submetidos a TPP através do sistema online ScholarOne, gratuitamente (<http://mc04.manuscriptcentral.com/tpp-scielo>). Antes de submeter um manuscrito, os autores devem ter preparado cuidadosamente os seguintes itens:

- a. Uma carta que afirme claramente que (i) todos os autores aprovam a submissão do manuscrito, (ii) os resultados não foram publicados e não estão sob consideração para publicação em outro periódico, (iii) os autores transferem os direitos autorais para a Sociedade Brasileira de Fitopatologia. Um autor para correspondência deve ser claramente indicado, e será responsável por toda a correspondência entre o os Editores e os autores;
- b. Um arquivo, incluindo o texto principal, tabelas e legendas de figuras, elaboradas em Word (doc ou docx) ou RTF (rtf).;
- c. Arquivos complementares contendo uma figura cada, preparados como arquivos TIFF ou JPEG. Figuras de baixa resolução pode ser usadas durante o processo de revisão para facilitar a transferência de arquivos, mas alta resolução (mínimo de 300 dpi) será necessária para a produção caso o manuscrito seja aceito.

O não cumprimento destas orientações implicará na rejeição imediata do manuscrito. A Comissão Editorial espera que os autores verifiquem a boa qualidade

do texto de todas as submissões. Correção de idioma não será realizada pelos Editores ou pelo Editor de Seção, e os trabalhos serão devolvidos aos autores caso o idioma exija correção.

Tipos de trabalhos

1 Artigo completo

Os manuscritos devem ser preparados em espaço duplo, fonte 12 em todo o texto, incluindo as referências, apêndices, tabelas e legendas das figuras. A configuração da página deve ser A4, com margens de 2,5 cm, numeração de página e de linha consecutivas, a partir da página de rosto.

Os seguintes elementos devem começar em uma nova página e ser ordenados conforme listados abaixo:

a) A **página de rosto** deve conter: um título conciso e informativo; os nomes (primeiro e último nome completo) dos autores; a filiação institucional ou onde a pesquisa foi realizada, incluindo departamento, instituição, CEP, cidade, estado ou província e país (notar que a filiação deve ser aquela onde o autor estava vinculado quando o trabalho foi realizado - no caso de o autor ter se transferido para uma instituição diferente, isso pode ser indicado separadamente como "endereço atual"); filiações diferentes são indicadas com números sobrescritos; o nome do autor para correspondência com endereço de correio eletrônico. O autor para correspondência é a pessoa responsável por verificar as provas tipográficas, organizar o pagamento de ilustrações coloridas e outras funções relacionadas com o processamento do manuscrito.

b) O **Abstract** deve ser em parágrafo único que não exceda 200 palavras, e resume os principais resultados e conclusões do estudo. Ele não deve conter referências.

c) As **Key words**: até seis palavras-chave devem ser incluídas, e estas devem diferir de palavras mencionadas no título. Devem começar com os nomes científicos dos hospedeiros e patógenos envolvidos no estudo (ou os mais relevantes), em ordem alfabética e ser seguidas por outras palavras-chave, também em ordem alfabética.

d) O texto deve ser o mais sucinto possível e incluir os seguintes elementos:

Introduction: descrição do histórico que levou ao estudo e a hipótese que está sendo testada, caso isso se aplique.

Material and Methods: descrição detalhada dos passos seguidos pelos autores, permitindo ao leitor a repetição o trabalho se disposto a fazê-lo. Evitar, sempre que possível, apenas se referir a uma outra publicação para a descrição completa da metodologia. Métodos estatísticos deve ser explicado no final desta seção.

Results: duplicação de texto e tabelas devem ser evitados. Comentário sobre a significância dos resultados é apropriado, mas uma discussão mais ampla deve ser parte da seção específica.

Discussion: os resultados do estudo devem ser colocados no contexto de dados relevantes previamente publicados. Idéias apresentadas em outras publicações não devem ser incluídas unicamente para aumentar o tamanho do artigo. Alguns

manuscritos podem exigir diferentes formatos, a fim de melhor atender ao seu conteúdo. Isso será avaliado caso a caso.

Citações no texto: artigos devem ser citados com os sobrenomes dos autores e a data de publicação; citações com dois autores deve incluir os dois nomes separados por "&"; em citações com três ou mais autores, listar apenas o nome do primeiro autor e utilizar "et al.". Lista de duas ou mais referências na mesma citação em ordem cronológica, separadas por ponto e vírgula. Quando dois ou mais trabalhos em uma citação foram publicados no mesmo ano, liste-os em ordem alfabética pelo sobrenome do primeiro autor. Para dois ou mais trabalhos do mesmo autor em uma citação, liste-os em ordem cronológica, com os anos separados por vírgulas. (Exemplo: Barreto et al., 2006a, 2006b, 2008). Apenas artigos publicados ou no prelo devem ser citados. No caso de "comunicação pessoal" ou "dados não publicados", todos os contribuintes devem ser listados por iniciais e sobrenome (et al. não deve ser usado).

Números: no texto, números abaixo de nove devem ser escritos por extenso, exceto como parte de uma data, uma fração ou decimal, uma porcentagem ou uma unidade de medida. Use algarismos arábicos para números maiores do que nove. Evite iniciar uma frase com um número, mas se isso for absolutamente necessário, escreva o número por extenso. URLs para programas, dados ou outras fontes devem ser listados no texto, ou como uma nota de rodapé. URLs para citações de publicações em revistas eletrônicas devem aparecer na seção Referências.

e) **Acknowledgments** deve ser um parágrafo único que segue imediatamente a seção Discussão, e inclui referências a concessão de apoio financeiro ou qualquer contribuição técnica ou intelectual.

f) As **referências** devem ser ordenadas alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor. Referências com o mesmo primeiro autor devem ser ordenados da seguinte forma: primeiro, como único autor em ordem cronológica, em segundo lugar, com apenas um co-autor em ordem alfabética pelo segundo autor, e terceiro, referências com mais de dois co-autores, em ordem alfabética pelos segundos autores ou subsequente. Títulos de periódicos não devem ser abreviados.

Os autores devem evitar a citação de teses, anais de eventos ou relatórios técnicos, principalmente por razões de acessibilidade. Um máximo de três citações desses tipos serão permitidas.

Apenas artigos publicados ou no prelo devem ser incluídos nesta seção. Manuscritos submetidos para publicação mas ainda não aceitos não podem ser citados. Comunicações pessoais e dados não publicados devem ser citados no texto. "Comunicação pessoal" refere-se a indivíduos que não sejam os autores do manuscrito sendo submetido; "dados não publicados" refere-se a dados obtidos por um ou mais dos autores do manuscrito submetido. Os autores devem apresentar provas adequadas para trabalhos "no prelo" e "comunicações pessoais".

Formato de referências

Artigo em periódico:

Reis RF, Goes A, Timmer LW (2006) Effect of temperature, leaf wetness, and rainfall on the production of *Guignardia citricarpa* ascospores and on black spot severity on sweet orange. *Fitopatologia Brasileira* 31:29-34.

Arnold AE, Medjía LC, Kylló D, Rojas EI, Maynard Z, Robbins N, Herre EA (2003) Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 26:15649-15654.

Capítulo de livro:

Campos VP, Villain L (2005) Nematode parasites of coffee and cocoa. In: Luc M, Sikora RA, Bridge J (Eds.) *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. Wallingford UK. CAB International. pp. 529-580.

Livro:

Agrios GN (2005) *Plant Pathology*. 5th Ed. Amsterdam. Elsevier Academic Press.

Livro editado:

Kimati H, Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A, Camargo LEA (Eds.) (2005) *Manual de Fitopatologia*. Vol. 2. *Doenças das Plantas Cultivadas*. 4ª. Ed. São Paulo SP. Ceres.

Documento eletrônico:

CONAB. Cana-de-açúcar, safra 2006 -2007. Available at: www.conab.gov.br/conabweb/download/BoletimCana-Novembro2006-07.pdf. Accessed on October 12, 2008.

Dissertação/Tese:

(Os autores devem evitar a citação de teses, anais de eventos ou relatórios técnicos, principalmente por razões de acessibilidade. Um máximo de três citações desses tipos serão permitidas.)

Zerbini FM (1996) Aspects of the epidemiology of lettuce mosaic in the Salinas Valley of California, and the production of LMV-resistant transgenic lettuce plants. PhD Thesis, University of California. Davis CA, USA.

Anais de eventos:

Igarashi S, Utiamada CM, Igarashi LC, Kazuma AH, Lopes RS (1986) Ocorrência de *Pyricularia* sp. em trigo no estado do Paraná. In: 14ª Reunião Nacional de Pesquisa de Trigo, Resumos... Londrina PR. IAPAR. p. 57.

Relatórios técnicos:

Fawcett HS (1911) Scaly bark or nail head rust of citrus. Florida Agriculture Experiment Station Bulletin 106.

g) **Tabelas:** tabelas devem ser inseridas após a seção Referências. Cada tabela deve começar em uma nova página. Um título conciso deve ser fornecido acima da tabela. As tabelas devem ser numeradas consecutivamente em algarismos arábicos. Cada coluna deve ter um título em letras minúsculas. Notas de rodapé devem ser digitadas diretamente abaixo da tabela, indicadas preferencialmente em números sobrescritos; letras minúsculas podem ser usadas quando os títulos das colunas contêm números.

h) As **figuras** devem ser numeradas consecutivamente em algarismos arábicos e devem ser dimensionadas de acordo com as colunas da revista. As legendas devem ser inseridas no texto principal, após as tabelas. Insira chaves e barras de escala, quando aplicável, diretamente na figura. Figuras digitalizadas não devem ser submetidas. As imagens devem estar em formato TIFF ou JPEG e ser fornecidas como arquivos separados. Figuras em formato Word não podem ser publicadas. Reprodução de qualidade exigirá tons de cinza e cor em resolução mínima de 300 dpi. Os autores devem apresentar bitmaps em resolução entre 600 e 1200 dpi. Estas resoluções referem-se ao tamanho de saída do arquivo; caso seja previsto que as imagens serão ampliadas ou reduzidas, as resoluções devem ser ajustados em conformidade. Cuidados especiais devem ser tomados com a qualidade das imagens. O procedimento normalmente utilizado para tirar fotos com uma câmara digital colocada acima de um microscópio ocular normalmente produz imagens de baixa qualidade com sombreado periférico, que são inadequadas para publicação. É altamente recomendável indicar detalhes de interesse em imagens com setas acompanhadas de explicações do que foi indicado na legenda.

i) A **nomenclatura** de nomes científicos deve estar em conformidade com as normas internacionais vigentes para cada classe de organismos. Os nomes científicos devem aparecer na íntegra e seguido pela autoridade na primeira vez em que aparecem no corpo do texto (mas sem autoridade no título, resumo, palavras-chave, tabelas ou legendas), e abreviado e sem autoridades daí em diante. Sempre que um nome científico aparecer no início de um período, deve ser escrito na íntegra.

Plantas: The International Plant Names Index, <<http://www.ipni.org/index.html>>

Fungos: Index Fungorum, <<http://www.speciesfungorum.org/Names/Names.asp>>

Bactérias: <http://www.isppweb.org/names_bacterial.asp>

Nematoides: <<http://www.iczn.org/iczn/index.jsp>>

Vírus: conforme o Código Internacional de Classificação e Nomenclatura, publicado no 9o Relatório do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus - ICTV (2012).

j) **Culturas e outros materiais de referência:** fonte e depósito de culturas devem ser indicados. Culturas e amostras-tipo que documentam a investigação, bem como sequências de nucleotídeos, devem ser depositado em bancos de dados certificados ou reconhecidos de instituições internacionais, e os números de adesão e local de depósito indicado no texto ou como uma nota de rodapé na página de rosto.

k) **Acesso aos dados:** deve ser feita referência à disponibilidade de dados detalhados e materiais utilizados para estudos relacionados.

l) **Abreviaturas e unidades:** unidades SI devem ser utilizadas, tais como mg, g, m, mm, L, mL, L, h, min, s, mol, kg /ha. Se uma abreviatura diferente do padrão for utilizada, ela deve ser definida na sua totalidade quando citada no texto pela primeira vez.

m) **Produtos fitossanitários:** somente nomes técnicos ou nomes de princípios ativos devem ser usados. Não é recomendável que os autores mencionem nomes comerciais de produtos ou das empresas que os produzem, de modo a não sugerir a utilização. Fórmulas químicas devem ser escritas em uma linha e seguir nomenclatura padrão.

2 Comunicação

Apresentam observações simples ou resultados que não justifiquem um artigo completo. Comunicações preliminares de trabalhos em andamento não se enquadram nesse formato. Primeiros relatos de doenças de plantas devem ser apresentados como Comunicação. Estes manuscritos devem conter ilustrações do patógeno, indicação de depósito de material de referência de acesso público, incluindo sequências de DNA (quando disponíveis ou em casos em que são indispensáveis), e documentação exigida pela legislação específica, tal como, no caso de registros do Brasil, obedecendo às regras estabelecidas pelo Ministério da Agricultura.

Comunicações devem conter 12 páginas ou menos, digitadas em formato A4, margens de 2,5 cm, em espaço duplo e fonte 12, incluindo referências, mas não tabelas e legendas. Devem incluir um abstract com não mais do que 200 palavras e nenhuma outra subdivisão. Todo o seu conteúdo deve estar em uma única seção (sem legendas como introdução, material e métodos, resultados e discussão). No máximo duas tabelas e duas figuras, ou qualquer combinação dos quatro itens, podem ser apresentados em uma comunicação. A página de rosto e o formato das referências são os mesmos de um artigo completo.

3 Carta ao Editor

Pode estar relacionada ou responder a artigos recentes de interesse para a área de Fitopatologia. Discussões sobre questões políticas, sociais e éticas de interesse para fitopatologistas também são bem-vindas neste formato. A Carta ao Editor não deve ter mais do que duas páginas digitadas em formato A4, margens de 2,5 cm, em espaço duplo e fonte 12, incluindo referências (se aplicável). Não devem incluir abstract ou qualquer subdivisão do texto. Caso seja absolutamente necessário, podem incluir uma figura ou tabela.

4 Artigo de revisão

Artigos de revisão são bem-vindos. Os autores devem contactar o editor antes da apresentação. Revisões são submetidas a revisão por pares da mesma forma que artigos completos. Revisões não devem ultrapassar 40 páginas digitadas em formato A4, margens de 2,5 cm, em espaço duplo e fonte 12, incluindo referências, tabelas e figuras. A página de rosto e o formato das referências são os mesmos de um artigo completo. Devem incluir um resumo com no máximo 200 palavras. O texto pode ser subdividido de acordo com o critério dos autores.

Provas

As provas tipográficas serão enviadas para o autor de correspondência. Notas adicionadas na prova requerem aprovação Editorial. As provas devem ser devolvidas no prazo de 72 horas.

Separatas

Separatas são gratuitas e estarão disponíveis como um arquivo pdf na página da TPP no portal SciELO.

Autoria

Autores que submetem manuscritos para Tropical Plant Pathology devem respeitar o valor da pesquisa de seus pares, não desvalorizando a co-autoria. Cada autor deve ter contribuído substancialmente para o desenho experimental, condução, análise ou interpretação dos resultados. Todos os autores devem aprovar a versão final do artigo a ser publicado, e devem assumir responsabilidade pública pela sua contribuição. O sistema de tramitação on line utilizado pela TPP disponibiliza ferramentas de detecção de plágio aos Editores, Editores de Seção e revisores. Detecção de plágio é motivo para a rejeição imediata de manuscritos.