

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

MARIANNA DOS SANTOS RODRIGUES ALENCAR

Fungos sapróbios do semi-árido nordestino no controle de *Alternaria solani*
em tomateiro

Maringá
2014

MARIANNA DOS SANTOS RODRIGUES ALENCAR

Fungos sapróbios do semi-árido nordestino para o controle de *Alternaria solani* em tomateiro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agronomia

Área de concentração:
Produção Vegetal

Orientador: Prof^a. Dr^a. Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada

Maringá
2014

MARIANNA DOS SANTOS RODRIGUES ALENCAR

**FUNGOS SAPRÓBIOS DO SEMI-ÁRIDO NORDESTINO NO CONTROLE DE
Alternaria solani EM TOMATEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Proteção de Plantas, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 21 de fevereiro de 2014.

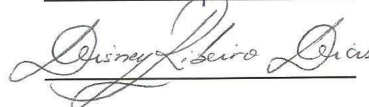
Profa. Dra. Kátia Regina Freitas Schwan Estrada
Presidente



Profa. Dra. Cacilda Marcia Duarte Rios Faria
Membro



Prof. Dr. Disney Ribeiro Dias
Membro



AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, meu Pai, meu Senhor, meu Escudo em todos os momentos. Agradeço a Ele pela oportunidade concedida, por sempre me guiar, me dando força, coragem, paciência e principalmente, ânimo nos momentos mais difíceis. **Obrigada meu Senhor por Sua presença viva em minha vida!**

Agradeço ao meu esposo Carlos O. Alencar Junior, por sempre me apoiar, ser companheiro e entender todas as vezes que o deixava só para realizar minhas pesquisas. Obrigada por ser meu amigo nas horas mais críticas e nas felizes também. Obrigada por ouvir minhas explicações sobre indução, crescimento micelial, esporulação e etc., pois sei que, mesmo não entendendo nada, você sempre me olhava com interesse e admiração, me deixando segura e confiante. Seu amor foi imprescindível para realização deste trabalho!

Agradeço à minha filha Rute, que ainda nem nasceu, que ainda no meu ventre foi minha inspiração para conclusão desta pesquisa! Obrigada filha!

Aos meus pais Osmar Rodrigues e Angela M^a. C. dos Santos Rodrigues agradeço por acreditarem em mim, por todo esforço dedicado ao meu crescimento, a minha educação e que permitiram que eu chegasse até aqui. Obrigada do fundo meu coração!

Aos meus irmãos Osmar Rodrigues Junior e Roberta dos Santos Rodrigues da Fonseca, pelo apoio.

Aos meus sogros Carlos O. Alencar e Amilte P. Sinigalia agradeço pela paciência, torcida e orações. Pelas palavras amigas e de apoio. Valeu mesmo!

Aos meus cunhados (Paula, Everton e Raíssa), meu muito obrigada!

A minha amiga e orientadora prof^a. Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada, um agradecimento especial pelas palavras de apoio, por seus ensinamentos, exemplo em todo momento. Suas palavras doces sempre me trouxeram paz e confiança para permanecer focada.

Agradeço a prof^a. Maria Eugênia da Silva Cruz (*in memoriam*), por ser exemplo de dedicação, sempre me inspirando e incentivando!

Agradeço aos meus amigos do laboratório, Antônio Jussie, Juliana Batista, Virlene Amaral, Mariana Saab e Lilianne Ribeiro. Vocês são parte de um todo! Obrigada por cada ajuda, por cada sugestão e principalmente, por todas as risadas que demos nestes anos que se passaram!

Obrigada Paulo, o técnico do laboratório, pela companhia, pelas dicas, por cada vidraria lavada, que nos remia o tempo!

Agradeço ao prof. Sergio Pascholati e toda equipe integrante do Projeto SISBIOTA. Cada reunião trazia esclarecimentos fundamentais para continuação da pesquisa.

Ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa!

Enfim, agradeço a todos que de maneira direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho!

Muito obrigada!

Fungos sapróbios do semi-árido nordestino no controle de *Alternaria solani* em tomateiro

RESUMO

O tomateiro é suscetível a muitas doenças, sendo uma das mais importantes a pinta preta, causada por *Alternaria solani*. A ocorrência de tantas doenças durante o cultivo do tomate ocasionam prejuízos econômico sendo necessário manejo de controle eficaz. O método de controle acessível aos produtores é o químico, proporcionando efeitos negativos ao meio ambiente e ao homem. A necessidade de estratégias alternativas para a redução e uso racional de defensivos mostra-se urgente. Portanto, objetivou-se neste trabalho avaliar a utilização de fungos sapróbios do semi-árido nordestino, para o controle de *Alternaria solani* do tomateiro através de sua possível ação direta por meio de antibiose e/ou produção de compostos voláteis, pela indução de mecanismos de resistência (ativação de proteínas relacionadas a patogênese) e pelo teor de clorofila, bem como avaliar os efeitos dos tratamentos na qualidade pós-colheita dos frutos. A antibiose foi avaliada pelo confronto direto dos fungos sapróbios *Stachylidium bicolor*, *Periconia hispidula*, *Brachysporiella pulchra*, *Myrothecium leucotrichum*, *Dictyosporium tetraseriale*, bem como o basidiomiceto *Pycnoporus sanguineus* com *A. solani* em dois diferentes meios de cultura o batata-dextrose-ágar (BDA) e milho-cenoura-ágar (MCA). Para avaliar o crescimento micelial de *A. solani*, discos de micélio foram transferidos para placas de Petri contendo meio BDA com os filtrados dos fungos sapróbios nas concentrações de 0,5, 10, 15 e 20% (v:v). A produção de compostos voláteis foi verificada utilizando-se placas de poliestireno divididas ao meio, contendo meio BDA. Em um dos lados foram colocados discos de micélio dos antagonistas. Três dias depois, no lado oposto, foi repicado um disco de micélio do fitopatógeno. No confronto direto notou-se que os isolados *B. pulchra*, *M. leucotrichum*, *D. tetraseriale* e *P. sanguineus*, em ambos meios de cultura, inibiram o crescimento micelial do fitopatógeno. O fungo *M. leucotrichum*, foi o único a formar halo de inibição, seguido de posterior crescimento do fungo sapróbio sobre o patógeno, indicando hiperparasitismo. *In vitro*, o tratamento com filtrado de *M. leucotrichum*, nas concentrações 10, 15 e 20%, inibiu o crescimento em 28,9; 27,4 e 32,6%, respectivamente. Não foi verificada produção de compostos voláteis capazes de reduzir o crescimento vegetativo do fitopatógeno. O experimento em casa de vegetação foi

constituído pelos filtrados dos sapróbios (20%), além dos controles água, ASM (0,5 mg i.a.mL⁻¹) e filtrado de *P. sanguineus* (20%) com os quais plantas de tomate foram tratadas três dias antes da inoculação para avaliar a severidade, a atividade enzimática, teor de clorofila e biometria das plantas. A severidade foi reduzida na 4^a folha tratada pelos tratamentos *S. bicolor*, *M. leucotrichum* e ASMem 96%, 35,8% e 92,3%, respectivamente. A atividade das enzimas peroxidase, β -1,3-glucanase e lipoxigenase foram maiores às 120 horas pós-inoculação nas plantas tratadas com o filtrado de *S. bicolor*. Os filtrados de *S. bicolor* e *M. leucotrichum* incrementaram os teores de clorofila a, b e total, bem como a altura das plantas. Entretanto, os tratamentos pré-colheita a campo não influenciaram a qualidade pós-colheita dos frutos de tomate. Estes estudos indicam a eficiência dos sapróbios *S. bicolor* e *M. leucotrichum* no controle alternativo da pinta preta do tomateiro.

Palavras-chaves: Controle alternativo. Antibiose. Indução de Resistência.

Saprobe fungi from the northeast semi-arid for controlling *Alternaria solani* in tomato plants

ABSTRACT

Tomato plant is susceptible to many diseases, being black spot one of the most important ones, caused by *Alternaria solani*. The occurrence of many diseases during the tomato cultivation cause economic losses, being necessary effective management control. Chemical is the most available method to producers, providing negative effects to the human being and environment. The need of alternative strategies to reduction and rational use of pesticides is urgent. Therefore, this study aimed to evaluate the use of saprobe fungi from the northeast semi-arid, for controlling *Alternaria solani* from the tomato plant through its possible direct action over antibiosis or production of volatile compounds by inducing resistance mechanisms (activation of proteins related to pathogenesis) and the physiological mechanism (chlorophyll), as well as evaluate the effect of treatments in the fruits postharvest quality. The antibiosis was evaluated by the direct confront of the saprobe fungi *Stachylidium bicolor*, *Periconia hispidula*, *Brachysporiella pulchra*, *Myrothecium leucotrichum*, *Dictyosporium tetraseriale*, as well as the basidiomycetes *Pycnoporus sanguineus* with *A. solani* in two different medium culture the potato-dextrose-agar (PDA) and corn-carrot-agar (MCA). To evaluate the mycelia growth of *A. solani*, mycelia discs were transferred to Petri dishes containing PDA medium with the filtered saprobes fungi at concentrations of 0,5, 10, 15 e 20%. The production of volatile compounds was verified using polystyrene plates halved containing PDA medium. On one side mycelia plates from antagonists were placed. Three days later, on the opposite site, a disc of mycelia phytopathogen was peaked. In the direct confront it was observed that the isolated *B. pulchra*, *M. leucotrichum*, *D.tetraseriale* and *P. sanguineus*, in both cultures, inhibited the mycelia phytopathogen growth. The fungus *M. leucotrichum*, was the only one to form halo inhibition, followed by further growth of saprobe fungi over the pathogen, indicating hyperparasites. *In vitro*, the treatment with the filtrate of *M. leucotrichum* at concentrations of 10, 15 and 20%, inhibited the growth in 28,9; 27,4 and 32,6%, respectively. The production of volatile compounds able to reduce the vegetative growth of the pathogen was not verified. The experiment in the greenhouse was composed by the filtrated of the saprobe (20%), in addition to water controls, BION[®] (0,5 mg i.a.mL⁻¹

¹) and filtrated of *P. sanguineus* (20%) where tomato plants were treated three days before the inoculation to evaluate the severity, enzyme activity, chlorophyll contents and biometric of plants. Severity was reduced in the 4th leaf treated by *S. bicolor*, *M. leucotrichum* and BION[®] in 96%, 35,8% and 92,3%, respectively. The activity of peroxidase β -1,3 glucanase and lipoxygenase were higher at 120 hours post-inoculation in plants treatment with the filtrate of *S. bicolor*, *M. leucotrichum* and BION[®] in 96%, 35,8% and 92,3%, respectively. The filtrates of *S. bicolor* and *M. leucotrichum* have increased the contents of chlorophyll a, b and total as well as the plants height. However, pre-harvest treatments performed in the field did not affect the post-harvest quality in tomato fruits. This study indicates the efficiency of the saprobe *S. bicolor* and *M. leucotrichum* in the alternative control of the black spot in the tomato plant.

Keywords: Alternative control. Antibiosis. Resistance Induction.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Médias de crescimento micelial dos diferentes sapróbios em dois meios de cultura: MCA (Milho-Cenoura-Ágar) e BDA (Batata-Dextrose- Ágar).....32
- Tabela 2. Teste de antibiose de isolados de fungos sapróbios em confrontação direta com *Alternaria solani*, em meio de cultura BDA e MCA, avaliando o crescimento micelial.....33
- Tabela 3. Médias das notas do teste de confrontação direta obtidas pelos sapróbios contra *Alternaria solani* utilizando a escala de Bell et al. (1982) em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA) e Milho-Cenoura-Ágar (MCA).....36
- Tabela 4. Crescimento micelial (cm) de *Alternaria solani* em diferentes concentrações de filtrados dos fungos sapróbios, em meio Batata-Dextrose-Ágar.....36
- Tabela 5. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para pinta preta na 3ª e 4ª folha do tomateiro em função do tratamento com filtrados de fungos sapróbios na concentração 20%, 3 dias antes da inoculação. Maringá, PR.....38
- Tabela 6. Atividade de peroxidase (Abs.min⁻¹mg⁻¹proteína) em folhas de tomate tratadas com filtrado de fungos sapróbios na concentração de 20%. Maringá, PR.....40
- Tabela 7. Atividade de polifenoloxidase (Abs.min⁻¹mg⁻¹proteína) em folhas de tomate tratadas com filtrado de fungos sapróbios na concentração de 20%. Maringá-PR.....41
- Tabela 8. Atividade de catalase (Abs.min⁻¹mg⁻¹proteína) em folhas de tomate tratadas com filtrado de fungos sapróbios na concentração de 20%. Maringá, PR..... 42
- Tabela 9. Atividade da β-1,3-Glucanase (mg glicose.min⁻¹mg⁻¹proteína) em folhas de tomate tratadas com filtrado de fungos sapróbios na concentração de 20%. Maringá, PR.....43
- Tabela 10. Atividade da lipoxigenase (Mmol hid.min⁻¹mg⁻¹proteína) em folhas de tomate tratadas com filtrado de fungos sapróbios na concentração de 20%. Maringá, PR.....44
- Tabela 11. Massa fresca da parte aérea (M.F.P.A) (g), massa fresca da raiz (M.F.R.) (g), altura de planta (A.P.) (cm) e comprimento de raiz (C.R.) (cm) de plantas de tomate em função dos tratamentos com o filtrado de fungos sapróbios (20%) e inoculadas com *Alternaria solani*.....46

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Ciclo de vida <i>Alternaria solani</i> em culturas de tomate e batata..... | 6 |
| Figura 2. Basidiocarpos de <i>Pycnoporus sanguineus</i> | 14 |
| Figura 3. Escala diagramática da pinta preta (<i>Alternaria solani</i>) em folíolos de tomateiro (BOFF, 1988)..... | 26 |
| Figura 4. Desenvolvimento dos fungos sapróbios em diferentes meios de cultura. A. <i>Stachilidium bicolor</i> ; B. <i>Periconia hispidula</i> ; C. <i>Brachysporiella pulchra</i> ; D. <i>Myrothecium leucotrichum</i> ; E. <i>Dictyosporium tetraseriale</i> | 32 |
| Figura 5. Halo de inibição formado no confronto direto do sapróbio <i>Myrothecium leucotrichum</i> (MYL) com <i>Alternaria solani</i> (AS)..... | 34 |
| Figura 6. A. Detalhes de hiperparasitismo entre <i>Pycnoporus sanguineus</i> (PYS) e <i>Alternaria solani</i> (AS); B. Esporos de <i>Myrothecium leucotrichum</i> (MYL) desenvolvidos sobre micélio <i>Alternaria solani</i> (AS)..... | 35 |
| Figura 7. Produção de compostos voláteis dos sapróbios em diferentes meios de cultura. A. <i>Stachilidium bicolor</i> ; B. <i>Periconia hispidula</i> ; C. <i>Brachysporiella pulchra</i> ; D. <i>Myrothecium leucotrichum</i> ; E. <i>Dictyosporium tetraseriale</i> | 37 |
| Figura 8. Teor de clorofila a, b e total (mg. peso fresco ⁻¹) em plantas de tomate. <i>Stachilidium bicolor</i> (STB); <i>Periconia hispidula</i> (PEH); <i>Brachysporiella pulchra</i> (BRP); <i>Myrothecium leucotrichum</i> (MYL); <i>Pycnoporus sanguineus</i> (PYS); CONT.=Água; BION= Acibenzolar-S-metil (0,5mg.mL ⁻¹)..... | 45 |

SUMÁRIO

| | | |
|---------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA..... | 3 |
| 2.1 | O tomateiro..... | 3 |
| 2.2 | Pinta preta do tomateiro..... | 4 |
| 2.2.1 | Sintomas..... | 5 |
| 2.2.2 | Epidemia..... | 5 |
| 2.2.3 | Controle..... | 7 |
| 2.3 | Controle alternativo de doenças..... | 7 |
| 2.3.1 | Controle biológico..... | 8 |
| 2.3.2 | Indução de Resistência..... | 9 |
| 2.4 | Indutores de Resistência..... | 11 |
| 2.4.1 | Acibenzolar-S-metil..... | 12 |
| 2.4.2 | Extratos fúngicos..... | 13 |
| 2.4.3 | <i>Pycnopus sanguineus</i> | 13 |
| 2.5 | Enzimas relacionadas à defesa de plantas..... | 14 |
| 2.5.1 | Peroxidase..... | 15 |
| 2.5.2 | Polifenoloxidase | 15 |
| 2.5.3 | Catalase..... | 16 |
| 2.5.4 | β -1,3-Glucanase..... | 17 |
| 2.5.5 | Lipoxigenase..... | 18 |
| 2.6 | Compostos Voláteis..... | 19 |
| 2.7 | Pós-colheita..... | 21 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 23 |
| 3.1 | Obtenção do fitopatógeno..... | 23 |
| 3.2 | Obtenção dos fungos sapróbios e do <i>Pycnopus sanguineus</i> | 23 |
| 3.3 | Obtenção dos tratamentos com fungos sapróbios..... | 23 |
| 3.4 | Ensaio experimentais..... | 24 |
| 3.4.1 | Experimentos <i>in vitro</i> | 24 |
| 3.4.1.1 | Teste de antagonismo..... | 24 |

| | | |
|---------|--|----|
| 3.4.1.2 | Crescimento micelial de <i>Alternaria solani</i> em filtrados dos fungos sapróbios..... | 24 |
| 3.4.1.3 | Produção de compostos voláteis..... | 25 |
| 3.4.2 | Controle da pinta preta em casa de vegetação..... | 25 |
| 3.5 | Análises bioquímicas..... | 26 |
| 3.5.1 | Determinação da atividade de peroxidase..... | 26 |
| 3.5.2 | Determinação da atividade de polifenoloxidase..... | 27 |
| 3.5.3 | Determinação da atividade de catalase..... | 27 |
| 3.5.4 | Determinação da atividade de β -1,3-Glucanase..... | 27 |
| 3.5.5 | Determinação da atividade de Lipoxigenase..... | 28 |
| 3.6 | Teor de clorofila..... | 28 |
| 3.7 | Biometria das plantas..... | 29 |
| 3.8 | Tratamentos a campo na qualidade pós-colheita de frutos de tomate cv. Cordilhera..... | 29 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 31 |
| 4.1 | Crescimento micelial dos sapróbios em diferentes meios..... | 32 |
| 4.2 | Teste de antagonismo..... | 32 |
| 4.3 | Crescimento micelial de <i>Alternaria solani</i> em filtrados dos fungos sapróbios..... | 34 |
| 4.4 | Produção de compostos voláteis..... | 35 |
| 4.5 | Controle da pinta preta em casa de vegetação..... | 36 |
| 4.6 | Análises bioquímicas..... | 38 |
| 4.6.1 | Atividade de peroxidase em guaiacol..... | 38 |
| 4.6.2 | Atividade da polifenoloxidase..... | 39 |
| 4.6.3 | Atividade da catalase..... | 41 |
| 4.6.4 | Atividade da β -1,3-Glucanase..... | 42 |
| 4.6.5 | Atividade da Lipoxigenase..... | 43 |
| 4.5 | Teor de clorofila..... | 44 |
| 4.6 | Biometria..... | 45 |

| | | |
|-----|---|----|
| 4.7 | Tratamentos a campo na qualidade pós-colheita de frutos de tomate cv. Cordilhera..... | 46 |
| 5. | CONCLUSÕES..... | 48 |
| 6. | REFERÊNCIAS..... | 49 |

1. INTRODUÇÃO

O tomate é um alimento funcional devido aos altos teores de pró-vitamina A e vitamina C, além de ser rico em licopeno. É pertencente à família das Solanáceas, a mesma da berinjela, pimentão, petúnia, fumo, batata e outras (MINAMI e HAAG, 1989), sendo originário da América do Sul. Classificado no gênero *Lycopersicon*, que inclui aproximadamente nove espécies, sendo oito silvestres e uma cultivada: *Solanum lycopersicum* L. (PERALTA; KNAPP; SPOONER, 2005) sin. *Lycopersicon esculentum* Mill.

A cultura do tomate é uma das mais expressivas no cenário agrícola mundial, constituindo importante produto para o comércio “in natura” e indústria de extratos (CARVALHO; PAGLIUCA, 2007). O tomate é cultivado em todo território brasileiro, principalmente nas regiões Centro-Oeste e Sudeste, sendo os maiores produtores, o Estado de Goiás seguido de São Paulo e Minas Gerais.

O tomateiro é afetado por mais de 200 doenças causadas por vírus, bactérias, fungos e nematoides, as quais contribuem para a baixa produtividade e qualidade da produção, comprometendo assim, sua comercialização. Dentre as doenças fúngicas, destaca-se a pinta-preta, causada por *Alternaria solani*(Ellis e Martin) Sorauer, que ocorre praticamente em todos os lugares do mundo onde o tomate é cultivado (JONES, 1991).

A ocorrência de tantas doenças durante o cultivo do tomate, principalmente doenças devastadoras que ocasionam grandes prejuízos econômicos, traz a necessidade de manejo de controle eficaz. O método mais acessível aos produtores é o químico, com utilizações periódicas de fungicidas, que proporcionam efeitos negativos ao meio ambiente e ao próprio homem.

A procura por alimentos saudáveis, ou seja, sem a contaminação por uso de agrotóxicos está crescendo mundialmente e dentre as hortaliças cultivadas em sistema orgânico, o tomate constitui uma boa oportunidade de negócio. Entretanto, existe certa dificuldade em cultivar o tomateiro em sistema orgânico, devido aos elevados problemas fitossanitários que a cultura apresenta (CASA, 2008).

Com o aumento da tecnologia na agricultura, objetivando o aumento da produtividade agrícola, impediu que outros fatores fossem levados em consideração, tais como o agricultor e o meio ambiente. Como resposta, surge a agricultura alternativa

de produção, restrita inicialmente, a pequenos produtores e atualmente insatisfatória para atender aos consumidores conscientes (ASSIS,2005).

O controle alternativo de plantas deve ser encarado como uma forma mais consciente de manejo da cultura, visando uma excelente produtividade agrícola, preservando o meio ambiente e proporcionando mais saúde aos produtores e consumidores.

Dentre o controle alternativo, tem-se a indução de resistência e o controle biológico como os métodos alternativos mais promissores. Cook e Bakker (1983) definem controle biológico como sendo “a redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno, realizada por outro através de um ou mais organismos, que não o homem. Já Indução de Resistência envolve a ativação de mecanismos de defesa latentes existente, os quais são induzidos sistemicamente em plantas pela utilização de agentes externos (indutores) bióticos ou abióticos, sem qualquer alteração do genoma da planta, ocorrendo de maneira não específica, por meio da ativação de genes que codificam para diversas respostas de defesa (HAMMERSCHMIDT et al., 2001).

Pode-se afirmar que, com o passar dos anos, a produção de alimentos por meio de sistemas que atendam aos requisitos da sustentabilidade ambiental, segurança alimentar e viabilidade econômica, tendem a ser uma realidade comum. Assim, no manejo de doenças de plantas, é fundamental integrar medidas de controle para viabilizar a produção, principalmente em cultivos em harmonia com ambiente. Em cultivos orgânicos ou sustentáveis, o uso de caldas, extratos, biofertilizantes, preparações homeopáticas e agentes de controle biológico pode reduzir a intensidade da doença (DINIZ et al., 2006). Entretanto, ainda não há agentes de controle biológico e biofertilizantes eficazes em reduzir a intensidade da pinta preta do tomateiro.

Neste contexto, busca-se uma combinação de medidas em programas de manejo, incluindo a indução de resistência e/ou controle biológico, visando propagar uma agricultura mais consciente e menos agressiva ao meio ambiente e ao homem.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização de fungos sapróbios do semiárido nordestino, para o controle de *Alternaria solani* do tomateiro através de sua possível ação direta antibiose e/ou produção de compostos voláteis, pela indução de mecanismos de resistência (ativação de proteínas relacionadas a patogênese) e de mecanismo fisiológico (clorofila), bem como avaliar os efeitos dos tratamentos na qualidade pós-colheita dos frutos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O Tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. sin. *Lycopersicum esculentum* Mill.)

O tomateiro tem como centro de origem a região andina, desde o Equador, passando pela Colômbia, Peru, Bolívia, até ao norte do Chile. Contudo, sua ampla domesticação se deu no México, chamado de centro de origem secundário (PERALTA; SPOONER, 2001).

Originalmente, de acordo com Linnaeus, o tomateiro integrava o gênero *Solanum*. Em 1974, Miller separou os tomates das batatas, criando um novo gênero denominado *Lycopersicon*, para diferenciar de *Solanum*. O tomateiro pertence à classe Dicotyledoneae, ordem Tubliflorae, família Solanaceae. Possui dois subgêneros: *Eulycopersicon* (tomates que apresentam coloração avermelhada quando maduros) e o *Eriopersicon* (apresentam frutos de cor verde, amarela ou esbranquiçada)(ALVARENGA, 2004).

O tomateiro é uma planta perene, de porte arbustivo, sendo cultivada anualmente e que apresenta dois hábitos de crescimento distintos, que condicionam o tipo de cultura: crescimento determinado (tomate industrial) e crescimento indeterminado (tomate de mesa). A compreensão desses hábitos passa pela anatomia da planta e pela fisiologia do seu crescimento. Anatomicamente, a planta é constituída de unidades independentes de fonte, representada pelas folhas e caule (órgãos vegetativos) e dreno, representado pelos frutos (órgãos reprodutivos). A distinção dos hábitos de crescimento está na posição dos ramos florais e na constituição das unidades de fonte e dreno (ALVARENGA, 2004).

As flores do tomateiro são pequenas e amarelas, em formato de cachos ou racemo e são hermafroditas, o que aumenta a taxa de autopolinização. Possui inflorescência cimeira de formas simples, bifurcadas ou ramificadas. O número de flores e o pegamento do fruto são intimamente influenciados por temperatura abaixo ou acima dos limites indicados para seu cultivo. Logo, a qualidade e quantidade de fruto é afetada com a permanência de temperatura acima de 28°C, prejudicando a firmeza e a cor dos frutos, que permanecem amarelados devido à inibição da síntese de licopeno e outros pigmentos de coloração avermelhada (SILVA e GIORDANO, 2000).

Segundo Melo (1989) o fruto do tomateiro é do tipo baga, com diferentes tamanhos e formatos, constituindo-se de película, polpa, placenta e sementes. Internamente, é dividido em lóculos onde as sementes encontram-se imersas na mucilagem placentária e, dependendo da cultivar, os frutos podem ser biloculares, triloculares, tetraloculares ou pluriloculares. No fruto maduro do tomate, a composição química é determinada na matéria sólida, que representa ao redor de 5% da polpa do fruto. No entanto, aproximadamente 92% dessa matéria seca são formadas por vários compostos carbônicos, metade dos quais se constitui açúcar como a glicose e frutose e 12,5% refere-se aos outros ácidos orgânicos que, conjuntamente com os açúcares, contribuem com o típico sabor ácido/doce (MORGAN, 2001). O formato do fruto define os tipos varietais do tomate de mesa no Brasil, considerando-se o Santa Cruz, salada ou caqui, saladete ou italiano, saladinha e cereja, como segmentos principais (FERREIRA et al., 2004).

O tomate é uma hortaliça que faz parte da dieta alimentar da maioria da população brasileira, sendo a segunda hortaliça mais consumida e cultivada. É a segunda no mundo, apenas superada pela cultura da batata (FILGUEIRA, 2003). Dentre as hortaliças, é uma das culturas mais importantes, não apenas em produção, mas também em valor socioeconômico. É a hortaliça mais industrializada, empregando grandes contingentes de mão-de-obra, com um mercado de derivados que explora principalmente a produção de extratos, molhos prontos e catchup (KROSS et al., 2001).

Em 2011, a safra mundial desse fruto, incluindo os segmentos de mesa e indústria, totalizou 159 milhões de toneladas, em área cultivada de 4,7 milhões de hectares e produtividade média de 33,6 t.ha⁻¹. O maior produtor mundial é a China, seguida pelos Estados Unidos, Turquia e Índia. O Brasil é o oitavo maior produtor com cerca de 63 mil hectares cultivados e uma produção que atinge 3,5 milhões de toneladas, com produtividade média de 56 t.ha⁻¹. Embora cultivado em quase todos os estados da federação, os cinco principais produtores são Goiás, São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Bahia (IBGE, 2012). Da produção total, 70% são destinados ao mercado para consumo *in natura* e o restante é matéria prima para industrialização (MAKISHIMA e MELO).

O cultivo do tomateiro exige alto nível tecnológico e intensa utilização de mão-de-obra, o que confere a esta cultura elevada importância econômica e social (LOPES et al., 2000; EMBRAPA Hortaliças, 2007), além de ser uma cultura onde mais de 200 doenças já foram relatadas, provocando diferentes níveis de redução de produtividade

ou de qualidade do produto comercial. Entre essas doenças uma das principais é a pinta-preta, causada por *A. solani* (KUROZAWA e PAVAN, 2005).

2.2 Pinta preta do tomateiro

A pinta preta, causada por *Alternaria solani* (Ellis & Martin) Sorauer, ocorre com frequência em tomateiro, atacando as hastes, folhas e fruto (KUROZAWA e PAVAN, 2005). As perdas são diretas, através da infecção dos frutos, e indiretas, através da redução do vigor da planta, além de danos aos frutos expostos aos raios do sol em decorrência da desfolha. A maior severidade da doença ocorre durante a fase de frutificação (VALE et al., 2000).

O agente da doença é um fungo mitosporico, que possui conídios com 150 a 300 µm de comprimento e 15 a 19 µm de largura, individuais ou raramente catenulados, retos ou levemente curvos, corpo oblongo ou elipsoidal e afina-se em direção ao ápice, com bico comprido, sinuoso ou ramificado com 2,5 a 5,0 µm de comprimento. Possui coloração parda, ouro claro ou palha e geralmente apresentam 9 a 11 septos transversais. Os conidióforos são septados retos ou sinuosos que ocorrem isolados ou em grupos, com 6 a 10 µm de diâmetro e 100 a 110 µm de comprimento, onde estão inseridos os conídios, possuindo a mesma coloração destes (ELLIS, 1971; HOOKER, 1981).

2.2.1. Sintomas

Em folhas, os sintomas expressam-se através de manchas necróticas, pardo-escuras, com a presença de anéis concêntricos e bordos bem definidos. Lesões em hastes e pecíolos podem surgir em plantas adultas e caracterizam-se por serem pardas, alongadas, deprimidas, podendo ou não apresentar halos concêntricos (ALVARENGA, 2004).

Nos frutos, os sintomas são caracterizados pela presença de manchas escuras, deprimidas e com a presença típica de anéis concêntricos, que geralmente se localizam na região do pedúnculo. A polpa sob a lesão é seca, coriácea e de cor amarela a castanha. Sintomas de tombamento podem ser verificados em plântulas de tomate afetadas pela doença (TÖFOLI, 2004).

O fungo ataca as folhas, hastes e frutos, resultando em desfolhamento das plantas, redução do rendimento e da qualidade dos frutos (CASTRO et al., 2000). A

doença caracteriza-se por causar intensa redução da área foliar, queda do vigor das plantas, depreciação de frutos e consequente redução do potencial produtivo (TÖFOLI, 2004).

2.2.2. Epidemia

A ocorrência de epidemias severas da doença está associada a temperaturas na faixa de 25 a 32° C e elevada umidade. O fungo *A. solani* sobrevive entre um cultivo e outro em restos de cultura infectados e solanáceas suscetíveis, podendo sobreviver ainda em equipamentos agrícolas, estacas e caixas usadas ou mesmo nas sementes. Além destas formas de sobrevivência, existe a possibilidade de o patógeno permanecer viável no solo na forma de micélio, esporos ou clamidósporos. Os conídios caracterizam-se por serem altamente resistentes a baixos níveis de umidade, podendo permanecer viáveis por até dois anos nestas condições. Uma vez presentes na cultura, são dispersos pela ação da água, ventos, trabalhadores, equipamentos, insetos e pelo contato e atrito entre folhas saudáveis e infectadas (Figura 1). Havendo umidade e calor suficientes, os conídios germinam e infectam as plantas rapidamente, podendo o fungo penetrar diretamente pela cutícula ou através de estômatos (TÖFOLI, 2006).

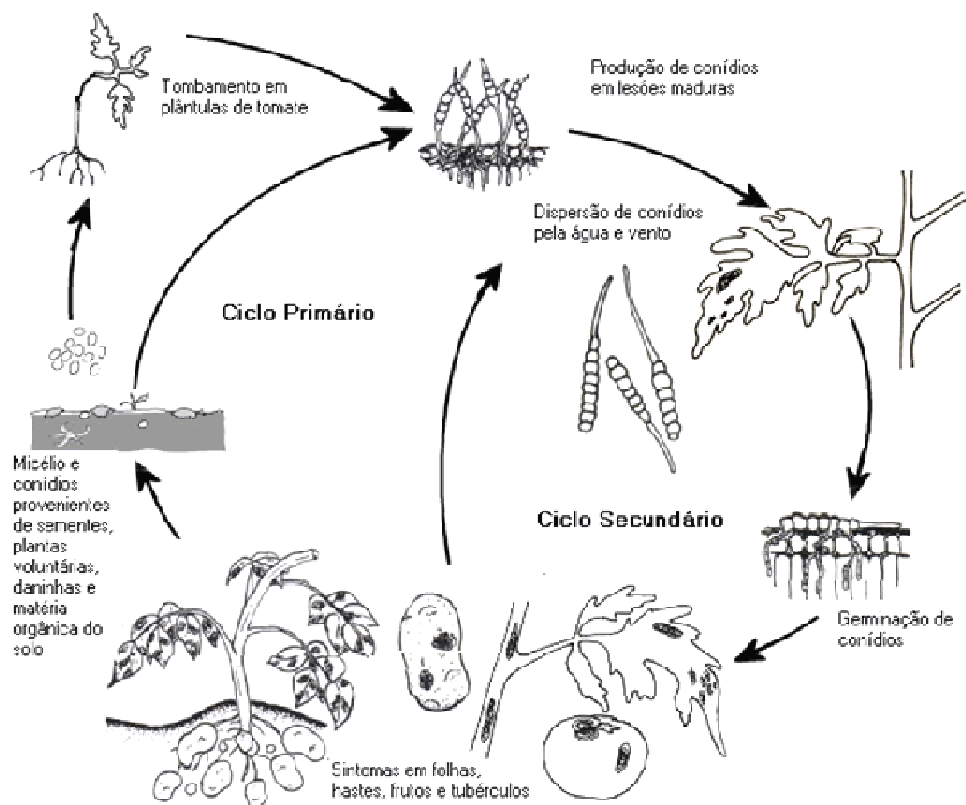


Figura 1. Ciclo de vida *Alternaria solani* em culturas de tomate e batata.
Fonte: www.infobibos.br

A colonização é intercelular, invadindo tecidos do hospedeiro, provocando alterações em diversos processos fisiológicos, que se exteriorizam na forma de sintomas. Em condições de campo, as lesões surgem 3 a 5 dias após a inoculação. Todavia em condições controladas, pontuações negras podem ser verificadas 24 horas após a inoculação (TÖFOLI, 2006).

Os conídios apresentam paredes celulares grossas conferindo resistência a baixas temperaturas e outras condições ambientais adversas (FOOLAD et al., 2008). Os tubos germinativos emergem dos esporos e se estendem sobre a superfície foliar. A infecção ocorre por penetração direta das células epidérmicas ou através dos estômatos ou ferimentos, após a formação de apressório. As lesões tornam-se visíveis sob condições favoráveis entre um a três dias após a inoculação (ROTEM, 1994, KUROZAWA; PAVAN, 2005, CHAERANI e VOORRIPS, 2006).

O ciclo de vida de *A. solani* é relativamente curto, o que permite infecções policíclicas. Além disso, o fungo sobrevive no solo, em semente e no ar, o que torna difícil o manejo desse patógeno pela rotação de cultivos e desinfecção de sementes (CHAERANI e VOORRIPS, 2006).

2.2.3. Controle

Os principais métodos de controle da pinta preta não fogem às adotadas em diversas culturas brasileiras, consistindo em um conjunto de medidas preventivas, tais como tratamento de sementes e/ou uso de mudas livres da doença; rotação de culturas com gramíneas; escolha de local para instalação de culturas evitando áreas de baixada e sujeitas a neblina e próximas a culturas de tomateiro; adubação equilibrada; pulverizações preventivas com fungicidas, bem como controle alternativo e indução de resistência (KUROZAWA; PAVAN, 2005).

2.3. Controle alternativo de doenças

O tratamento de doenças com fungicidas químicos sintéticos é amplamente utilizado na agricultura. Esta prática trouxe muitos benefícios, porém são muitos os males que podem acarretar ao ser humano e ao meio ambiente. O uso indistinto e demasiado destes tratamentos químicos trouxe como consequência a crescente

resistência de pragas, microrganismos fitopatogênicos e ervas daninhas aos produtos sintéticos(COUTINHO,1996).

O aumento da tecnologia na agricultura, objetivando maior produtividade agrícola, impediu que outros fatores fossem levados em consideração, tais como o agricultor e o meio ambiente. Como resposta, surge a agricultura alternativa de produção, restrita, inicialmente, a pequenos produtores e atualmente insatisfatória para atender aos consumidores conscientes (ASSIS,2005).

O consumidor tem se conscientizado cada vez mais no tocante a conservação do meio ambiente, visto que a utilização desenfreada de agroquímicos passou a ser repensada e a busca por novas medidas de proteção das plantas contra as doenças começou a ganhar notoriedade.

O controle alternativo engloba todas as medidas de controle que não incluem o controle químico clássico e o melhoramento genético de plantas para resistência às doenças. Envolve o controle biológico e a indução de resistência em plantas e as medidas englobadas pelo controle alternativo podem ser visualizadas como de ocorrência natural durante as interações hospedeiro-patógeno. Necessita-se apenas da interferência do homem para a possível utilização em escala comercial das mesmas. Alguns autores, no entanto, classificam a indução de resistência como um tipo de controle biológico (PASCHOLATI, 1998).

O controle alternativo de plantas deve ser encarado como uma forma mais consciente de manejo da cultura, visando uma excelente produtividade agrícola, preservando o meio ambiente e proporcionando mais saúde aos produtores e consumidores.

2.3.1. Controle biológico

O controle biológico tem como premissa manter a densidade populacional das espécies de pragas associadas à agricultura, em níveis economicamente e ecologicamente aceitáveis (LIMA et al., 2000).

Cook & Bakker (1983) definem controle biológico como sendo a redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno, realizada por outro através de um ou mais organismos que não o homem, através da ação direta de outro microrganismo antagônico, o qual pode atuar por meio de antibiose, parasitismo, competição, predação ou hipovirulência. Também pode-se citar como mecanismos de atuação antagônica a produção de enzimas extracelulares,

interferência nos fatores de patogenicidade, indução de resistência e nichos de colonização (PUNJA e UTKHEDE, 2003).

Não há uma característica única que possa ser identificada nos agentes de controle biológico para explicar como eles se manifestam como antagonistas aos fitopatógenos, entretanto, diversas características importantes têm surgido a partir das investigações científicas com relação aos modos de ação. É provável que os diferentes mecanismos atuem em sinergia durante a interação antagônica (PUNJA e UTKHEDE, 2003).

2.3.2. Indução de Resistência

A indução de resistência em plantas pode ser definida como uma resistência dinâmica baseada na produção de barreiras físicas e/ou químicas estimuladas pela aplicação de uma substância indutora. É um fenômeno sistêmico ou local, efetivo contra uma ampla gama de patógenos, incluindo bactérias, fungos ou vírus (BONALDO et al. 2005; SILVA, 2007; SOARES et al., 2004).

O termo indução de resistência pode ser utilizado para designar uma proteção local, isto é, a indução de resistência apenas nos tecidos onde se efetuou o tratamento com o agente indutor, como também pode indicar uma resistência sistêmica, que se manifesta à distância do local de aplicação do indutor (STICHER; MAUCH-MANI; MÉTRAUX, 1997).

A resistência do hospedeiro a um microrganismo patogênico pode ser definida, sob o aspecto fisiológico, como a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e/ou a subsequente atividade do patógeno em seus tecidos (PASCHOLATI; LEITE, 1995).

Na natureza, resistência é regra e suscetibilidade exceção, pois todas as plantas se desenvolvem sob constante ameaça de seus inimigos, sejam eles herbívoros ou patógenos (AGRIOS, 2005; PASCHOLATI; LEITE, 1995). Entretanto, as plantas não aceitam passivamente a agressão por parte de seus inimigos, pois possuem mecanismos de resistência pré-formados e pós-formados que podem ser estruturais ou bioquímicos (PASCHOLATI; LEITE, 1995).

Os mecanismos pré-formados apresentam barreiras já existentes antes do contato com o patógeno e que visam conter a agressão, sendo que estas barreiras são denominadas de defesas constitutivas e são representadas por mecanismos estruturais como: ceras, cutícula, parede celular espessa, tricomas, adaptações em estômatos e

fibras vasculares, bem como substâncias bioquímicas pré-formadas, como fenóis, alcalóides, lactonas insaturadas, glicosídeos fenólicos, glicosídeos cianogênicos, fototoxinas, inibidores protéicos e enzimas hidrolíticas (AGRIOS, 2005; PASCHOLATI; LEITE, 1995).

Além destes, também existem os mecanismos de resistência pós-formados que são ativados ou aumentam a concentração de compostos pré-existentes após a infecção do patógeno. Estes mecanismos envolvem a formação de papila, halo, lignificação, camada de cortiça, formação de tiloses e deposição de goma, que são os mecanismos estruturais, já os compostos constituintes dos mecanismos bioquímicos pós-formados são fitoalexinas e espécies reativas de oxigênio (AGRIOS, 2005; PASCHOLATI; LEITE, 1995). Dentre os mecanismos bioquímicos, podemos destacar ainda, as proteínas constitutivas das plantas ou relacionadas à patogênese (proteínas-RP), as quais são induzidas nos tecidos vegetais em resposta à infecção com patógenos, pelo tratamento com agentes bióticos e abióticos, ou outras situações de estresse, ou seja, através de reações de defesa (NARUSAKA et al., 1999; GUZZO, 2004). Essas proteínas apresentam como característica a estabilidade em pH baixo (2,8) e altas temperaturas (60-70° C), resistência à ação de enzimas proteolíticas, estando localizadas no vacúolo, parede celular e/ou apoplasto (STINTIZI et al., 1993).

A busca por cultivares mais resistente e com boas características agronômicas e comerciais sempre foi o objetivo do melhoramento genético, que por muito tempo visou essa seleção, sem, contudo, levar em consideração os mecanismos naturais que conferem resistência em plantas. Porém, plantas podem ser induzidas a desenvolverem aumento de resistência à infecção por patógenos pelo tratamento com uma variedade de indutores bióticos e abióticos. Os agentes indutores podem ter origem biótica ou abiótica, são capazes de induzir qualquer resposta de resistência nas plantas e são chamados de elicitores (BONALDO; PASCHOLATI; ROMEIRO, 2005), podendo apresentar natureza química variada, como oligossacarídeos, glicoproteínas, oligopeptídeos e ácidos graxos (STANGARLIN et al., 1999).

O conhecimento sobre a indução de resistência em plantas contra patógenos é secular e sabe-se que envolve a ativação de mecanismos inativos ou latentes na planta (STICHER; MAUCH-MANI; MÉTRAUX, 1997). Foi conceituada como sendo a ativação de um estado de resistência contra doenças, o qual é induzido sistemicamente em plantas pela utilização de agentes externos (indutores) bióticos ou abióticos, sem qualquer alteração do genoma da planta, ocorrendo de maneira não específica, por meio

da ativação de genes que codificam diversas respostas de defesa (HAMMERSCHMIDT et al., 2001).

Em verdade, autoridades contemporâneas parecem concordar que Resistência Sistêmica Adquirida (RSA) e Resistência Sistêmica Induzida (RSI) são fenômenos distintos quanto à forma através da qual são induzidos e desencadeados, governados por mecanismos bioquímicos diferentes, mas bastante semelhantes, se não idênticos, no que concerne ao resultado fenotípico final que se expressa sob forma de indução de resistência, resistência essa com caráter de sistemicidade (ROMEIRO, 2009).

A RSA envolve o acúmulo de PRPs (Proteínas Relacionadas à Patogênese) como mecanismos induzidos de defesa da planta. Sua indução pode resultar em alterações visuais (necroses, por exemplo) na planta que sofreu indução e geralmente é induzida por patógenos ou ativadores químicos. A RSA promove uma série de alterações bioquímicas e estruturais, destacando-se o acúmulo de ácido salicílico e espécies reativas de oxigênio, reforço de parede celular por lignificação (ANTEROLA & LEWIS, 2002), aumento na atividade de enzimas relacionadas a vias secundárias do metabolismo e síntese de fitoalexinas (HEIL et al., 2002). No caso de RSI, não há acúmulo de PRPs, a planta que sofreu indução não exhibe alterações, o agente indutor é usualmente um não patógeno e sua indução não é salicilato dependente, parecendo haver outra rota de sinalização mais associada à jasminatos e etileno. Assim, a RSA e RSI envolvem múltiplos eventos bioquímicos e fisiológicos compondo um mecanismo de resistência induzida contra a infecção. Ao mesmo tempo, patógenos desenvolveram estratégias de adaptação para sobrepor à indução de resistência sistêmica (MALAMY et al., 1996).

A RSA é, então, explicada pela manifestação ou produção de um sinal liberado a partir do sítio de infecção que provoca a necrose e a translocação deste sinal para outras partes da planta, induzindo reações de defesa que protegerão a planta contra agressões subsequentes. Na resistência sistêmica induzida (RSI), o indutor não provoca sintomas, como necrose no local da infecção, que induz a planta a se proteger sistemicamente (SILVA et al., 2008).

É importante salientar que a atividade do agente indutor não é devida à ação antimicrobiana ou a sua transformação em agentes antimicrobianos, mas sim devida à capacidade do mesmo em sensibilizar a planta e a mesma ativar os seus mecanismos de defesa estruturais e bioquímicos em resposta à presença de um patógeno em potencial.

Usualmente é complexa e tem como base a ação combinada de diversos fatores e não apenas um componente (SOARES & MACHADO, 2007).

2.4. Indutores de resistência

Os indutores de resistência não devem apresentar normalmente ação antimicrobiana direta sobre patógenos (GUZZO et al., 2001), mas atuar como moléculas sinalizadoras de respostas de defesa. Ao serem reconhecidas pelas células vegetais induzem a expressão de genes que codificam a síntese de compostos de resistência (RYALS et al., 1996) impedindo ou dificultando o estabelecimento e/ou desenvolvimento do patógeno e, conseqüentemente, reduzindo os sintomas da doença.

Para que um composto seja considerado um sinalizador, é necessário que este seja sintetizado pela planta, aumente significativamente após o ataque de patógeno ou após o tratamento com o indutor, seja móvel pelo floema da planta, induza a síntese de substâncias de defesa, como as proteínas-RP, peroxidases ou fitoalexinas e aumente a resistência a patógenos (BOSTOCK, 1999; MORAES, 1998).

Vários agentes podem induzir a produção de sinais no vegetal, disparando reações que protegerão a planta de forma mais curta ou duradoura contra uma ampla gama de fitopatógenos (RESENDE et al., 2002). Os agentes indutores ou ativadores de resistência podem ser microrganismos saprofíticos, patógenos de plantas, metabólitos microbianos, extratos de plantas, agentes químicos, entre outros (SCHWAN-ESTRADA et al., 2003; DI PIERO et al., 2005; SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN, 2005).

2.4.1. Acibenzolar-S-Metil

O éster S-metil do ácido benzo (1,2,3) tiadiazol-7 carbotiônico (conhecido por Bion®, BTH ou ASM) foi produzido e liberado comercialmente na Alemanha como o primeiro ativador de defesa vegetal (GÖRLACH et al., 1996), visando a indução de resistência sistêmica em plantas. No ano de 2001, essa molécula foi registrada no Brasil sob o nome comercial de Bion® (CASTRO, 2003; CASTRO et al., 2007).

O ativador vegetal induziu resistência em plantas como fumo, pepino, tomate e feijão, porém várias aplicações foram necessárias para reduções significativas nos sintomas (HAMMERSCHMIDT; DANN, 1997). O ASM é facilmente translocado no interior da planta e não exibe efeito antimicrobiano direto. Aparentemente, o ASM estimula as mesmas respostas de defesas observadas após o tratamento das plantas com o ácido isonicotínico (INA), sendo provavelmente outro análogo funcional do ácido

salicílico (GÖRLACH et al., 1996). O ASM proporcionou redução na severidade da mancha angular em plantas de algodão e conferiu maior aumento nas atividades das enzimas fenilalanina amônia-liase, peroxidase e beta-1,3-glucanase e na deposição de lignina (ISHIDA et al., 2008).

2.4.2. Extratos fúngicos

Os filtrados de fungos, seja micelial ou de basidiocarpo, têm sido amplamente pesquisados e os resultados têm-se apresentado promissores na redução da severidade de diversas doenças (DI PIERO et al., 2005; IURKIV et al. 2006).

Pesquisas demonstram o efeito de suspensões de células da levedura *S.cerevisiae* (linhagem de panificação), bem como do filtrado dessas suspensões na proteção de plantas de sorgo contra *Colletotrichum graminicola* e *Exserohilum turcicum* (LOPEZ, 1991; PICCININ, 1995), milho contra *C.graminicola* e *E. turcicum* (SILVA & PASCHOLATI, 1992; STANGARLIN & PASCHOLATI, 1994), maracujá contra *Xanthomonas campestris* pv. *passifora* e eucalipto contra *Botrytis cinerea* (PICCININ, 1995).

Pesquisas evidenciaram a obtenção de elicitores glicoproteicos de *S. cerevisiae*, os quais estimulam o acúmulo de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo (WULFF & PASCHOLATI, 1998, 1999; LABANCA, 2002).

O fungo *Colletotrichum lindemuthianum* induz a resistência das plantas à antracnose, aumentando a atividade de peroxidase, polifenoloxidase e compostos fenólicos em quatro cultivares de feijão (Rio Tibaji, AB 136, Carioca e Macanudo), apresentando resultados semelhantes o indutor ácido salicílico (CAMPOS et al, 2009). Os autores verificaram correlação positiva entre as atividades da peroxidase e da polifenoloxidase, os teores de compostos fenólicos e a resistência à antracnose.

Di Piero e Pascholati (2004) com o objetivo de avaliar o potencial dos cogumelos *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* para a indução de resistência, trataram plantas de pepino com extratos destes cogumelos e verificaram redução na severidade da antracnose em plantas de pepino, causado por *Colletotrichum lagenarium*, tanto local quanto sistemicamente e que o extrato de *L. edodes* provocou um aumento nas atividades de quitinase e parcialmente de peroxidases nas plantas tratadas.

2.4.3. *Pycnoporus sanguineus*

Entre os basidiomicetos com propriedades eliciadoras destaca-se *Pycnoporus sanguineus* (L. ex Fr.) Murr.(Figura 2), utilizado desde a medicina popular (SMÂNIA et al., 1995) até ao controle alternativo de doenças de plantas (ASSI, 2005; BENINCA, 2007), com potencial para a indução de resistência quando se usa o extrato de seus basidiocarpos. É conhecido popularmente como orelha-de-pau, pertence ao filo Basidiomycota e a família Polyporaceae (NOBLES & FREW, 1962).

Pazuch (2007) verificou que extratos aquosos de basidiocarpos, micélio e filtrado de cultura de *P. sanguineus* possuem atividade indutora de fitoalexinas em cotilédones de soja e mesocótilos de sorgo. Meinerez et al. (2007) verificaram que extratos aquosos de basidiocarpo de *P. sanguineus* apresentam potencial indutor de resistência em cotilédones de soja, através da produção de fitoalexinas e incremento na atividade de peroxidase.



Figura 2. Basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus*. Fonte: Viecelli, 2008.

Filtrados de cultura de *P. sanguineus* reduziram a severidade de *Phaseolus vulgaris*, agente causal da mancha angular do feijoeiro, tanto local como sistemicamente, por meio do aumento da atividade de enzimas de defesa como peroxidase e polifenoloxidase. Alterações fisiológicas como o teor de proteínas e clorofilas foram incrementadas nas plantas de feijoeiro tratadas com os extratos, indicando a eficiência destes em reduzir a doença (VIECELLI et al., 2008).

2.5. Proteínas relacionadas à defesa de plantas

A quantidade de proteínas presente ou inativadas no tecido vegetal podem sofrer grandes alterações quando desafiado por patógenos ou agentes elicitores, indicando a ativação dos mecanismos de defesa da planta e a importância de se estudar as enzimas-chaves na indução de resistência (VIECELLI, 2008).

2.5.1. Peroxidase (POX) (EC 1.11.1.7)

As peroxidases apresentam várias funções na defesa celular, pela sua participação na lignificação, suberização e metabolismo de parede celular (KUHN, 2007). Algumas das peroxidases são induzidas durante o estresse causado por patógenos ou elicitores (HIRAGA et al., 2001), sendo consideradas como Proteínas Relacionadas à Patogênese (RP-proteínas) pertencentes à família PR-9 (VIDHYASAKARAN, 2008).

A expressão das peroxidases também está correlacionada com a ocorrência de infecção por patógenos. Quando sofrem ataque de patógenos, as plantas sintetizam um conjunto de RP proteínas (VAN LOON et al., 1994). Existem relatos de que as peroxidases são induzidas em infecções de plantas causadas por fungos (THORDAL-CHRISTENSEN et al., 1992), por bactérias (RASMUSSEN et al., 1995), por vírus (HIRAGA et al., 2000) e por viróides (VERA-ESTRELA et al., 1993).

As peroxidases atuam no processo de defesa reforçando a parede celular por meio da formação de lignina, de suberina, de polissacarídeos ferulicolados, de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (DI PIERO; PASCHOLATI, 2004), aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) que atuam como mediadores na sinalização, agindo como agentes antimicrobianos (KAWANO; MUTO, 2000) e induzindo a produção de fitoalexinas (KRISTENSEN et al., 1999).

Na indução de resistência, as peroxidases são largamente estudadas por participar efetivamente no processo de defesa das plantas, aumentando sua atividade na presença de patógenos causadores de infecções e agentes elicitores, o que está diretamente relacionado à redução da severidade de doenças (KUHN, 2007).

Silva et al. (2004) observaram expressivo aumento na atividade de peroxidase em tomateiro induzido por *Bacillus cereus* (isolado de solo rizosférico) contra os patógenos

A. solani, *Corynespora cassiicola*, *Oidium lycopersici*, *Stemphyllim solani* e *X. campestris* pv. *vesicatoria*.

2.5.2. Polifenoloxidase (PFO) (EC 1.10.3.2)

As polifenoloxidases agrupam um conjunto de enzimas responsáveis pela catálise da reação de oxidação de polifenóis originando quinonas altamente tóxicas aos microrganismos, proteínas também denominadas de fenol oxidases, catecolases, fenolases, catecol oxidases ou tirosinases (PASCHOLATI; LEITE, 1995; VAUGHN et al., 1988). São enzimas intracelulares que ocorrem em animais, plantas, em várias espécies de bactérias e numerosos fungos (FLURKEY, 1989; WHITAKER, 1994).

As polifenoloxidases permanecem inativadas intracelularmente, compartimentalizadas dentro dos tilacóides nos cloroplastos e separadas dos compostos fenólicos, compartimentalizados nos vacúolos. Uma pequena parte pode, no entanto, estar extracelularmente na parede celular (VAUGHN et al., 1988). A liberação das polifenoloxidases ocorre quando a planta hospedeira sofre o ataque de patógenos iniciando a oxidação dos compostos fenólicos (MOHAMMADI; KAZEMI, 2002).

Os produtos de oxidação do ácido clorogênico pela polifenoloxidase, asquinonas, atuam de várias formas na defesa de plantas frente a patógenos. A reatividade de clorogenoquinona impede o desenvolvimento de patógenos acelerando a taxa de morte celular em células próximas ao local atacado (sítio de infecção) e/ou gerando um meio tóxico, que inibe diretamente o crescimento do patógeno nas células vegetais (PETER, 1989). A polifenoloxidase também pode atuar na formação de H₂O₂ pela oxidação enzimática rápida dos fenóis que ocorre na infecção por patógenos (RICHARD-FORGET; GAUILLARD, 1997). Peng et al. (2004) induziram a atividade da polifenoloxidase 72 horas após o tratamento de pepino com pectinases extraídas de *Penicillium oxalicum* contra *Cladosporium cucumerinum*, reduzindo em até 70% a severidade da doença. Ramamoorthy et al. (2002) induziram resistência em tomate e pimenta, a partir do tratamento de sementes, com diversos isolados de *Pseudomonas fluorescens* e observaram redução de 50% do tombamento causado por *Pythium aphanidermatum*, estando esta proteção relacionada ao aumento significativo na atividade da polifenoloxidase, juntamente com os efeitos também proporcionados pelo aumento da fenilalanina amônia-liase e peroxidase.

2.5.3. Catalase (CAT) (EC 1.11.1.6)

A catalase é uma enzima tetrâmera que contém grupo heme e que converte a H_2O_2 em água e oxigênio molecular. Sua função principal é prevenir os efeitos potencialmente danosos causados por mudanças na homeostase do H_2O_2 . As catalases são as principais enzimas que detoxificam H_2O_2 em plantas, podendo dismutar H_2O_2 diretamente ou oxidar substratos tais como metanol, etanol, formaldeído e ácido fórmico (VAN BREUSEGEM et al., 2001).

A catalase remove a maior parte do H_2O_2 , enquanto a ascorbato peroxidase pode detoxificar o H_2O_2 , que é inacessível para a catalase devido a sua alta afinidade por H_2O_2 e a sua presença em vários locais dentro da célula (SCANDALIOS, 1994; CREISSEN; EDWARDS; MULLINEAUX, 1994).

Esta enzima está dividida em três classes: classe 1- encontradas em tecidos fotossintéticos sendo responsáveis por remover o H_2O_2 produzido durante a fotorrespiração; classe 2- encontradas nos tecidos vasculares; classe 3 – encontradas em sementes e plantas jovens e são responsáveis pela remoção do H_2O_2 produzido durante a catálise de ácidos graxos no glioxissomas (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003).

As plantas apresentam múltiplas isoformas de catalase, as quais estão presentes nos peroxissomas e nos glioxissomas (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003). Kuzniak et al. (2005) verificaram que plantas de tomate inoculadas com *Botrytis cinerea* apresentaram maior atividade de CAT um e dois dias após a inoculação em relação às plantas não inoculadas.

2.5.4. β -1,3- glucanase (GLU) (EC 3.2.1.6)

As β -1,3-glucanases pertencem à família PR-2 e são agrupadas em três classes distintas baseando-se nas sequências de aminoácidos de suas estruturas primárias. As glucanases da classe I são proteínas básicas e estão localizadas no vacúolo da célula vegetal, especialmente na epiderme de folhas inferiores e nas raízes de plantas saudáveis, enquanto as das classes II e III incluem, principalmente, as proteínas ácidas extracelulares (SELITRENNIKOFF, 2001).

As PR proteínas presentes nos vacúolos geralmente exercem um efeito de defesa após a descompartimentalização das células, enquanto que as PR proteínas extracelulares atuam diretamente em contato com o patógeno no processo de penetração do tecido (STICHER et al., 1997). A atividade antifúngica de β -1,3-glucanase provém de sua ação

catalítica na hidrólise do polímero de β -1,3-glucana, componente estrutural da parede celular de muitos fungos.

A síntese e acúmulo de β -1,3 glucanases em tecidos vegetais têm sido associados aos mecanismos de defesa de plantas contra doenças, demonstradas em ensaios *in vitro* e *in vivo* (FRITIG et al., 1998; STICHER et al. 1997). A atividade antifúngica destas enzimas deve-se principalmente à ação catalítica na hidrólise do polímero de β -1,3 glucanases, componente estrutural da parede celular de muitos fungos (FRITIG et al., 1998). Segundo os autores a ação catalítica da proteína ocasiona lise e morte celular dos fitopatógenos expostos a elas.

A expressão diferencial de β -1,3 glucanases em interações compatíveis e incompatíveis frente a patógenos obrigatórios vem sendo estudada por vários autores. Em plantas resistentes de melão, trigo e milho, frente a *Sphaerotheca fusca*, *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* e *Sclerospora graminicola*, respectivamente, detectou-se maior atividade de β -1,3 glucanase (RIVERA et al. 2002; KEMP et al., 1999; KINI et al., 2000), associado com aumentos precoces na atividade da enzima ou indução diferencial de isoformas.

Dann et al. (1996) induziram resistência em feijoeiro com INA (ácido 2,6-dicloroisonicotínico) na primeira folha verdadeira e observaram aumento de β -1,3 glucanase e quitinase tanto nesta folha, quanto nos primeiros e segundos trifólios da planta.

Rodrigues et al. (2006), verificaram os efeitos dos indutores ASM e quitosana (suspensão proveniente de micélio de *Crinipellis pernicioso*) em cultivares de caupi contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* no aumento das enzimas β -1,3 glucanases e concluíram que estas enzimas contribuíram na redução da severidade da doença.

2.5.6. Lipoxigenase (LOX) (E.C.1.13.11.12)

Lipoxigenases são enzimas que catalisam a adição de oxigênio molecular aos ácidos graxos poliinsaturados contendo o sistema cis, cis - 1,4 - pentadieno (AXELROD et al., 1981; MACK et al., 1987) para formação dos respectivos derivados hidroperóxidos, originando moléculas reativas (FARMER e RYAN, 1992). Catalisa a formação de hidroperóxidos de ácidos graxos poliinsaturados, o que origina compostos voláteis e o regulador traumatina, entre outros, envolvidos no crescimento, na

maturação, na senescência e em respostas de defesa das plantas (BAYSAL & DEMIRDOVEN, 2007).

Em vegetais o ácido araquidônico é pouco encontrado e os principais substratos para a lipoxigenase são o ácido linolênico e o ácido linoleico (SIEWDON, 1991). Os produtos da via da lipoxigenase têm sido associados com várias funções como no desenvolvimento vegetal (KOLOMIETS et al., 2001), ativação de estoques lipídicos em sementes (FEUSSNER et al., 2001; GERHARDT et al., 2005), crescimento vegetativo (FISCHER et al., 1999), amadurecimento de frutos (GRIFFITHS et al., 1999), defesa contra herbívoros (CREELMAN e MULLET, 1997) e patógenos (RANCÉ et al., 1998).

A expressão do gene da lipoxigenase é regulada por diferentes fatores como jasmonatos (AGRAWAL et al., 2004), ácido abscísico (MELAN et al., 1993), e também por diferentes formas de estresse, como ferida, deficiência de água (PORTA et al., 1999) ou ataque de patógenos e insetos herbívoros (PORTA et al., 2008). Além da localização citoplasmática da LOX (PORTA e SOSA, 2002), é descrito o acúmulo em diversos compartimentos celulares tais como no estroma de cloroplastos (HEITZ et al., 1997; FROEHLICH et al., 2001; RANGEL et al., 2002), vacúolos (FEUSSENER et al., 1995) e mitocôndrias (BRAIOT et al., 1993). Contudo, pesquisas indicam que a LOX encontrada no cloroplasto está comprometida com o mecanismo de defesa de plantas em resposta a ferimentos e tratamento com metil jasmonato (BELL et al., 1995; FEUSSNER e WASTERNAK, 2002; RANGEL et al., 2002).

Heitz et al. (1997) investigaram em plantas de tomate a expressão da lipoxigenase durante a resposta de defesa vegetal. Neste trabalho foram isolados dois clones de cDNA que codificam lipoxigenases denominados TomLOXC e TomLOXD. A análise da expressão destes genes demonstrou o aumento dos transcritos de TomLOXD após o ferimento mecânico, tratamento com metil jasmonato e sistemina. Os transcritos de TomLOXC foram somente detectados no processo de amadurecimento dos frutos.

Jardim (2009) observou que genes da lipoxigenase responderam satisfatoriamente aos tratamentos por metil jasmonato, ferida mecânica e herbivoria. Almeida (2012) avaliando, por meio de enzimas marcadoras, a indução de resistência à ferrugem-asiática-da-soja em genótipos de soja contrastantes quanto à suscetibilidade a *Phakopsora pachyrhizi*, observou que plantas do genótipo Embrapa 48, submetidas ou não à inoculação, apresentaram alta atividade das lipoxigenases durante todo o período avaliado, indicando a presença de formas constitutivas e induzidas da enzima.

2.6. Compostos voláteis

A importância dos compostos orgânicos voláteis antimicrobianos recebeu pouca atenção quando comparado ao antagonismo causado por substâncias difusíveis (CHAURASIA et al., 2005). Esses compostos pertencem às diversas classes químicas tais como álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, lactonas, terpenos e compostos de enxofre (WHEATLEY, 2002).

O fenômeno de estímulo e/ou inibição micelial e germinação de esporos fúngicos por compostos presentes na fase gasosa parece ser um evento multifuncional, dependente de vários eventos somados (FRENCH, 1992).

A vulnerabilidade das estruturas fúngicas aos compostos voláteis está diretamente relacionada com o local onde estas estruturas estão inseridas. Os fungos possuem cada uma de suas células vegetativas expostas ao meio onde vivem, desenvolvendo parte do micélio e porções de seus órgãos reprodutivos no ar (FRIES, 1973), o que determina uma relação superfície/volume alta. Alguns compostos liberados no ar acumulam-se mais rapidamente na membrana plasmática de uma célula receptora do que se estivesse na fase líquida (STOTZKY et al., 1976).

Devido à volatilidade, estes compostos são menos suscetíveis que compostos não voláteis em solução a várias formas de inativação. Além disso, compostos se difundindo em meio líquido estão mais expostos a substâncias químicas inativadoras. Por consequência, a esfera de influência de compostos voláteis é muito maior (WHEATLEY, 2002).

Algumas pesquisas indicam que compostos voláteis ou de misturas artificiais de voláteis, apresentam promissora atividade no combate de uma ampla gama de patógenos fúngicos e bacterianos (MERCIER; JIMÉNEZ, 2004; MERCIER; SMILANICK, 2005).

Wheatley (2002) estudou interações mediadas por voláteis entre uma ampla gama de fungos e bactérias de solo e demonstrou que os isolados fúngicos tiveram o crescimento micelial estimulado em até 40% ou inibido em até 60%, dependendo do isolado bacteriano.

Melo et al. (2012), observaram que *Xanthomonas vesicatoria* submetidas a compostos voláteis produzidas pelos fungos sapróbios *Dictyochoeta simplex*, *Gonytrichum chlamydosporium*, *Stachybotrys globosa*, *Curvularia inaequalis* e

Volutella mínima apresentaram inibições do crescimento bacteriano de 53,9; 54,7; 59,5; 60,9 e 77,6%, respectivamente.

Fialho et al. (2010) demonstraram que compostos voláteis constituídos por álcoois são os principais responsáveis pela bioatividade de *Saccharomyces cerevisiae* contra o fungo *Guignardia citricarpa*. Esses voláteis atuaram reduzindo a síntese de proteínas e a atividade enzimática do patógeno. Segundo esses autores, os voláteis 3-metil-1-butanol e 2-metil-1-butanol, em alta concentração foram capazes de suprimir de forma completa o desenvolvimento de *G. citricarpa*.

2.7. Pós-colheita

O tomate tem sido produzido em todo mundo, com tecnologias cada vez mais eficazes no ponto de vista produtivo, porém esses avanços tecnológicos alcançados na produção de tomate não foram acompanhados por desenvolvimento equivalente na fase pós-colheita (LANA et al., 2006).

A valorização dos conceitos de qualidade de produtos hortícolas faz com que a pesquisa se preocupe cada vez mais com os processos pós-colheita, tentando encontrar maneiras para que a vida útil desses produtos se prolongue preservando ao máximo a sua qualidade (CASTRO, 2003).

Segundo Ferreira et al (2000), o conceito de qualidade do tomate se refere àqueles atributos que o consumidor consciente ou inconscientemente estima que o produto deve possuir. Porém, é necessário ampliar esse conceito de qualidade e aplicá-lo não só ao consumidor, mas também a todos que participam da cadeia produtiva, isto é, desde o cultivo até o consumidor.

A avaliação da qualidade pós-colheita de frutas e hortaliças é uma prática rotineira e os objetivos podem ser os mais variados, avaliação do efeito de diferentes fatores ou tratamentos pré-colheita na qualidade pós-colheita, e/ou avaliação da qualidade do produto colhido após o mesmo ter sido submetido aos diversos tratamentos pós-colheita, visando à extensão da vida útil (MORETTI, 2006). Por ser o tomate um fruto sensível, o armazenamento adequado retarda o amadurecimento, mantém a qualidade e prolonga a conservação (BRACKMANN et al., 2007). Desta forma, o entendimento dos processos de maturação do tomate de mesa e as características de qualidade dos frutos na armazenagem são fundamentais para a comercialização, visto que no mercado, somente aqueles produtos que correspondem às expectativas do consumidor são comercializados (FERREIRA et al., 2010).

Fisiologicamente, o tomate é fruto climatérico, pois apresenta um pico de atividade respiratória no processo de maturação pós-colheita. É a partir desse pico que começa o processo de deterioração, ocasionando mudanças bioquímicas, alterando o odor, sabor e valor nutricional (CARVALHO, 1990), o que proporciona uma série de transformações em suas características físicas e químicas, dentre elas perda da clorofila, síntese de carotenoides, aumento do pH, maior porcentagem de sólidos solúveis e amolecimento (LUENGO et al., 2001). Para avaliar essas mudanças, alguns parâmetros de qualidade têm sido empregados na análise da composição, como acidez, sólidos solúveis, teor de açúcar, teor de licopeno, aparência, textura, sabor, tamanho e suculência (MONTEIRO et al., 2008).

Segundo Pinheiro et al., (1984) o teor de sólidos solúveis (SS) é de grande importância nos frutos, tanto para consumo *in natura* como para processamento industrial, pois elevados teores desses constituintes implicam em menor adição de açúcares, menor tempo de evaporação da água, menor gasto de energia e maior rendimento do produto resultando em maior economia no processamento. A porcentagem de sólidos solúveis, que é representada pelo °Brix inclui os açúcares e os ácidos e tem influência sobre o rendimento industrial.

A acidez total titulável (AT) mede a quantidade de ácidos orgânicos, indica a adstringência do fruto e também influencia o sabor. Esse parâmetro é avaliado por meio de titulação com NaOH, sendo os resultados expressos em concentração de ácido cítrico (SILVA & GIORDANO, 2000). Segundo Kader et al., (1978), o fruto do tomateiro é considerado saboroso quando apresenta a proporção SS/AT superior a 10.

Quanto ao parâmetro pH, seu aumento está relacionado com diminuição da concentração de ácidos orgânicos no fruto, porque estes são usados como fonte de energia durante a respiração e, como fonte de vitamina C para síntese de açúcares (AWAD, 1993). De acordo com Lapuerta (1995), os valores considerados padrão para pH em tomates, são de 4,2 a 4,4.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção do Fitopatógeno

Para isolar o fitopatógeno *Alternaria solani*, foram coletadas folhas de tomate exibindo sintomas típicos das doenças e o isolamento foi inicialmente realizado em meio ágar-água e posteriormente, plaqueado em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA), a 28 °C, por 2 a 3 dias, para a obtenção de colônias puras. O isolado de *A. solani* puro foi mantido em câmara de crescimento (B.O.D), a uma temperatura de 28 + 2 °C, no escuro por 7 dias.

3.2. Crescimento dos fungos sapróbios em diferentes meios de cultura

Os isolados dos fungos sapróbios *Stachylidium bicolor* (14/7), *Periconia hispidula*(42/7), *Brachysporiella pulchra* (67/8), *Myrothecium leucotrichum*(69/6), *Dictyosporium tetraseriale*(141/7) foram cedidos pela Universidade Estadual de Feira de Santana. Estes fungos foram plaqueados em dois meios de cultura (Batata-Dextrose-Ágar [BDA] e Milho-Cenoura-Ágar [MCA]) para verificar o melhor meio para o desenvolvimento dos sapróbios. Os fungos plaqueados foram mantidos em B.O.D, a uma temperatura de 25°C, no escuro, por 14 dias.

O isolado de *P. sanguineus* foi cedido pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná e foi plaqueado em meio BDA e mantido em B.O.D. a uma temperatura de 25°C no escuro por 14 dias.

3.3. Obtenção dos filtrados dos fungos sapróbios e do *P. sanguineus*

Os fungos cultivados em BDA (*S. bicolor*, *P. hispidula*, *B. pulchra*, *M. leucotrichum*, *D. tetraseriale* e *P. sanguineus*) foram repicados para meio de cultura BD (Batata-Dextrose), autoclavados a 120 °C e 1 atm por 20 minutos. Cada erlenmeyer contendo 200 mL de meio BD recebeu dois discos de 7mm dos meios com micélios dos

fungos sendo mantidos em B.O.D a uma temperatura de 25°C, no escuro, por 20 dias (PAZUCH, 2007).

Após este período, os meios líquidos contendo os fungos sapróbios foram filtrados em papel Whatman n° 1, de modo que o conteúdo líquido (filtrado) fosse separado do micélio. Uma segunda filtragem foi realizada em sistema Millipore com membrana de 0,45 µm de diâmetro de poro, para esterilização do extrato (BALDO, 2008).

Os filtrados obtidos foram diluídos em água destilada esterilizada para se obter as concentrações de 0, 5, 10, 15 e 20% que foram utilizadas nos teste *in vitro*.

3.4. Ensaios experimentais

Os experimentos foram conduzidos em 2 etapas: *in vitro* e *in vivo*: Os experimentos *in vitro*, foram para verificar a atividade antifúngica direta por meio de substâncias tóxica e em placas de poliestireno subdivididas, para verificar produção de compostos voláteis; *in vivo* foram realizados experimentos em casa de vegetação para verificar a ativação de RP-proteínas e o controle da pinta preta, bem como verificar a interferência nas características biométricas da planta; e a campo visando avaliar a qualidade pós-colheita dos frutos de tomate que foram tratados com os filtrados dos fungos sapróbios em pré-colheita.

3.4.1. Experimentos *in vitro*

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Indução de Resistência e Controle Alternativo, localizado no Bloco T33 da Universidade Estadual de Maringá – UEM, em Maringá, PR, no período de outubro de 2011 a junho de 2013.

3.4.1.1. Teste de antagonismo

No teste de antagonismo foram confrontados os fungos sapróbios com *Alternaria solani* em delineamento inteiramente casualizado, com 5 repetições. Discos contendo micélio (7mm) dos fitopatógenos foram repicados em placas de Petri (90 mm), contendo meio BDA e MCA, a uma distância de aproximadamente 1,0 cm da borda, em seguida, fez-se a repicagem dos isolados de fungos sapróbios nas placas de Petri, em posição oposta à colônia do patógeno. As placas foram incubadas em B.O.D, com temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas, pelo período de 7 dias. Nas avaliações mediu-se o tamanho do halo de inibição e também utilizou-se a metodologia de Bell et

al. (1982), atribuindo-se a seguinte escala de nota: 1- Antagonista cresce por toda placa; 2 – Antagonista cresce sobre 2/3 da placa; 3 – Antagonista e patógeno crescem até 1/2 da placa; 4- patógeno cresce sobre 2/3 da placa e 5 – patógeno cresce por toda a placa.

Os dados foram submetidos à análise de variância a 5% de probabilidade e posteriormente comparados pelo teste de Scott Knott a 5 % de probabilidade.

3.4.1.2. Crescimento micelial de *Alternaria solani* em filtrados dos fungos sapróbios

Neste ensaio, foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), com seis tratamentos e cinco repetições.

Alíquotas dos filtrados foram adicionadas em água destilada esterilizada para obtenção das concentrações 0%, 5%, 10%, 15% e 20%. Em seguida, foram adicionados ao meio BDA fundente. Posteriormente, discos de micélio de 7 mm de diâmetro provenientes de colônia puras de *A. solani*, previamente preparadas, foram transferidos para placas de Petri ($\varnothing = 90$ mm) contendo meio de cultura BDA com as concentrações dos filtrados. As placas foram acondicionadas em B.O.D., a 25 °C, no escuro. A avaliação do crescimento micelial foi realizada medindo-se o diâmetro médio das colônias quando o patógeno tomou 2/3 das placas do tratamento controle.

Os dados foram submetidos à análise de variância a 5% de probabilidade e posteriormente comparados pelo teste de Scott Knott a 5 % de probabilidade.

3.4.1.3. Produção de compostos voláteis

Para verificar a produção de metabólitos voláteis pelos sapróbios, foram utilizadas placas de poliestireno subdivididas ao meio, contendo meio BDA e outras contendo meio MCA. Em um dos lados foram colocados discos de micélio dos antagonistas (sapróbios). Três dias depois, no lado oposto, foi repicado um disco de micélio do fitopatógeno. As placas foram mantidas em B.O.D, a 25°C sob fotoperíodo de 12h. A avaliação do crescimento radial do micélio foi feita através da média entre duas medições diametralmente opostas, quando a colônia das placas controle atingiu os bordos. (FIALHO, 2004).

3.4.2. Controle da pinta preta em casa de vegetação

O experimento foi conduzido em casa de vegetação próxima ao Laboratório de Indução de Resistência e Controle Alternativo, do Departamento de Agronomia da UEM, em Maringá, PR no período de novembro de 2012 a janeiro de 2013.

Sementes da cultivar Santa Cruz Kada foram semeadas em bandejas contendo substrato comercial para produção de mudas de hortaliças. Após 20 dias foram transplantados para vasos de 5 L (duas plantas por vaso) contendo preparado com terra de barranco, areia e húmus na proporção (3:1:1, p:p:p). O experimento foi realizado em DIC com 7 tratamentos e 5 repetições.

Os filtrados dos fungos sapróbios (item 3.3), na concentração de 20% (v:v), foram pulverizados até o ponto de escorrimento na planta inteira de tomate quando a planta apresentava de quatro a cinco folhas totalmente desenvolvidas. Plantas tratadas com água e com os indutores de resistência (Acibenzolar-S-metil-ASM [0,5 mg.i.a.mL⁻¹] e *P. sanguineus* [item 3.3]) serviram como controle negativo e positivo, respectivamente.

A inoculação foi realizada 3 dias após a aplicação dos tratamentos, pulverizando uma suspensão de 10⁴ conídios mL⁻¹ de *A. solani* em todas as folhas do tomateiro. Posteriormente as plantas foram mantidas em câmara úmida por cerca de 12 horas.

A avaliação da severidade da pinta preta iniciou-se a partir da observação dos primeiros sintomas nas plantas, atribuindo-se notas de severidade aos folíolos da 3^a e 4^a folhas de cada planta, com o auxílio de escala diagramática de Boff (1988) (Figura 3). Foram realizadas 5 avaliações com intervalos de 4 dias.

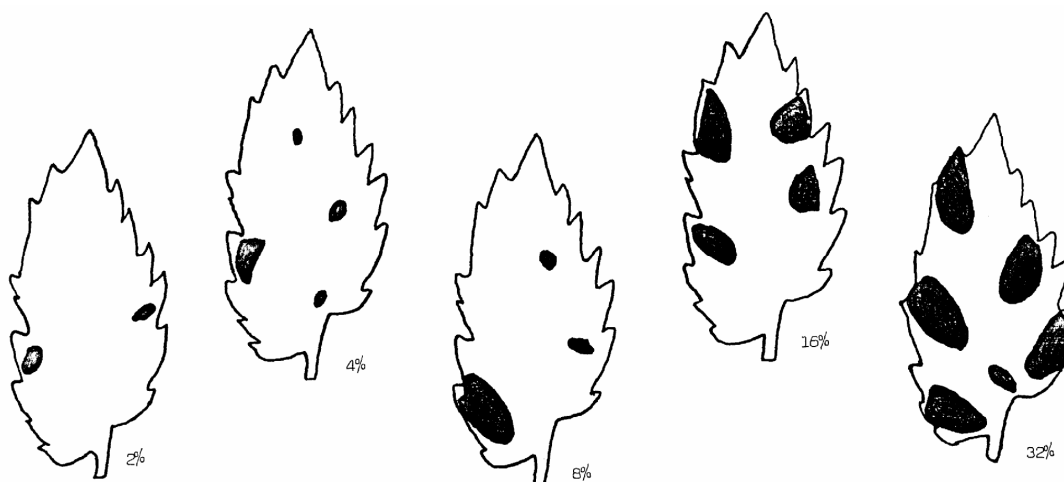


Figura 3. Escala diagramática da pinta preta (*Alternaria solani*) em folíolos de tomateiro (BOFF, 1988).

Com as avaliações de severidade da doença, procedeu-se a construção da curva de progresso da doença a determinação da área abaixo da curva da doença (AACPD), por meio da equação proposta por Campbell e Madden (1990):

$$AACPD = \sum_{i=1}^n \left[\left(\frac{y_{i+1} + y_i}{2} \right) * (t_{i+1} - t_i) \right]$$

n = número de avaliações;

y = intensidade da doença na i-ésima avaliação;

t = tempo no momento da i-ésima.

Os dados foram submetidos à análise de variância e comparados pelo Teste de Scott-Knott à 5% de probabilidade.

3.5. Análises Bioquímicas

Para a determinação das PRP (proteínas relacionadas a patogênese) foram coletados folíolos da 3ª folha do tomateiro nos tempos 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após-inoculação com patógeno *A. solani*. As folhas foram pesadas em balança de precisão e colocadas em saquinho de papel alumínio e em seguida depositadas em caixa de isopor com gelo, para resfriamento rápido, e posteriormente transportadas ao laboratório. As amostras destinadas para análise bioquímica foram armazenadas em freezer, a uma temperatura de -18 °C, para posterior análise.

3.5.1. Determinação da atividade de peroxidase

A atividade da peroxidase foi determinada a 30°C, utilizando o método espectrofotométrico direto, pela medida da conversão do guaiacol em tetraguaiacol em 470 nm (LUSSO; PASCHOLATI, 1999). Para isso, foi misturado 0,20 mL do extrato enzimático e 2,8 mL de solução com 250µL de guaiacol e 306 µL de peróxido de hidrogênio em 100 mL de tampão fosfato 0,01M (pH 6,0). A atividade da peroxidase foi determinada por um período de 2 minutos. A diferença entre a leitura aos 90 s e a leitura

aos 30 s foi utilizada para a determinação da atividade da enzima. Os resultados foram expressos em absorvância $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína.

3.5.2. Determinação da atividade de polifenoloxidase

A atividade da polifenoloxidase foi determinada usando-se a metodologia de Duangmal e Apenten (1999), na qual foi realizada quantificação da oxidação do catecol convertido em quinona, reação mediada pela enzima polifenoloxidase. O substrato foi composto por catecol, na concentração de 20 mM, dissolvido em tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 6,8). A reação foi desenvolvida misturando-se 900 μL do substrato e 100 μL do extrato enzimático. A temperatura de reação foi de 30°C e as leituras em espectrofotômetro, a 420 nm, foram realizadas de forma direta por um período de 2 minutos. A diferença entre a leitura do primeiro minuto e a leitura inicial foi utilizada para a determinação da atividade. Os resultados foram expressos em absorvância $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína.

3.5.3. Determinação da atividade de catalase

A atividade da catalase (CAT) foi quantificada pelo método de Goth (1991), modificado por Tománková et al. (2006), através do complexo estável formado pelo molibdato de amônio com peróxido de hidrogênio. O extrato enzimático (0,1 mL) foi incubado em 0,5 mL de mistura de reação contendo 60 mM de peróxido de hidrogênio em tampão fosfato de potássio 60 mM pH 7,4 a 38°C por 4 min. A adição de 0,5 mL de 32,4 mM de molibdato de amônio após 4 min de incubação foi feita para deter o consumo de peróxido de hidrogênio pela enzima presente no extrato. Foi preparado um branco para cada amostra através da adição de molibdato de amônio a mistura de reação, omitindo o período de incubação. O complexo amarelo de molibdato e peróxido de hidrogênio foi medido a 405 nm. A diferença entre a absorvância do branco e a amostra incubada indicou a quantidade de peróxido de hidrogênio utilizado pela enzima. A concentração de H_2O_2 , foi determinada utilizando-se o coeficiente de extinção $\epsilon = 0,0655 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.5.4. Determinação da atividade de β -1,3- glucanase

Para determinação da atividade da β -1,3-glucanase, foi adicionado 150 μL do extrato enzimático em 150 μL de laminarina (1,5 mg mL^{-1}) em tampão de extração (acetato de sódio 100 mM pH 5,2). Como controle, foi utilizada a mesma reação, onde a

laminarina foi adicionada imediatamente antes da determinação de açúcares. A reação foi mantida a temperatura 40 °C durante 60 min, em banho-maria. Após o período de incubação, os açúcares redutores formados foram quantificados pelo método de Lever (1972). Para isso, retirou-se uma alíquota de 50 µL dos tubos incubados e adicionado 1,5 mL de solução de hidrazida do ácido *p*80 hidroxibenzoico 0,5% em NaOH 0,5 M. A mistura foi mantida em banho-maria fervente por 5 min e resfriada em banho de gelo.

A leitura das absorbâncias foi realizada a 410 nm, em espectrofotômetro descontando-se os valores de absorbância do branco. Determinou-se a quantidade de açúcares utilizando-se curva-padrão de concentrações de glicose, variando de 0 a 85 µg glicose mL⁻¹.

3.5.5. Determinação da atividade da lipoxigenase

A lipoxigenase foi avaliada pela absorbância a 234 nm em linoleato de sódio 10 mmol L⁻¹, pH 9,0, como substrato, em mistura de reação constituída de 1.000 µL de fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 6,0, 20 µL do substrato e 10 µL do extrato vegetal, conforme Silva et al. (2004). O coeficiente de extinção molar (ϵ) do hidroperóxido para o ácido linoleico foi 25.000 mol L⁻¹ cm⁻¹, a pH 6,0. A atividade específica da lipoxigenase foi expressa em µmol de hidroperóxido do ácido linoleico por minuto por µg de proteína.

3.5.6. Determinação das proteínas totais

O teste de Bradford (1976) foi empregado para a quantificação do conteúdo total de proteínas nas amostras. A cada 50 µL do sobrenadante foi adicionado, sob agitação, 2,5 mL do reagente de Bradford. Após 5 min foi efetuada a leitura da absorbância a 595 nm em espectrofotômetro. A concentração de proteínas, expressa em mg por mL de amostra (mg proteína mL⁻¹), foi determinada utilizando-se curva-padrão de concentrações de albumina de soro bovino (ASB) de 0 a 0,5 mg mL⁻¹.

3.5. Teor de clorofila

Para a quantificação de clorofila, amostras de tecido vegetal foram acondicionadas em frascos de vidro com 10 mL de acetona 80%, durante 7 dias. Após esse período realizou-se leitura no espectrofotômetro a 663nm e 645 nm para clorofila *a* e *b*, respectivamente. A concentração de clorofila *a* obteve-se pela fórmula (0,0127.

A_{663}) – (0,00269. A_{645}) e para clorofila *b* (0,0229. A_{645}) – (0,00468. A_{663}). O teor de clorofila total foi obtido pela soma dos resultados. Os valores foram expressos em mg. g⁻¹ peso fresco (ARNON, 1949).

3.6. Biometria de plantas

O crescimento das plantas foi determinado pela diferença da primeira avaliação, realizada antes da aplicação dos tratamentos, e a segunda avaliação realizada 30 dias depois. Para a avaliação foi utilizado fita métrica.

Para determinação da massa fresca parte aérea (M.F.P.A), massa seca da parte aérea (M.S.P.A), massa fresca da raiz (M.F.R.) e massa seca da raiz (M.S.A.), as plantas foram separadas em raiz e parte aérea. As raízes foram lavadas para retirada de solo e substratos e separada da parte aérea analisando-as em balança semi-analítica. A massa seca foi obtida após secagem em estufa de circulação forçada a 60°C até apresentar peso constante. Os valores de massa foram expressos em gramas.

3.7. Tratamentos a campo na qualidade pós-colheita de tomate cv. Cordillera

O experimento foi realizado no setor de Agroecologia da Fazenda Experimental de Iguatemi, que possui certificação para o cultivo orgânico pela ECOCERT Brasil (certificação participativa), da Universidade Estadual de Maringá (FEI/UEM), no período de inverno e primavera de 2013.

O delineamento experimental foram blocos ao acaso, com quatro repetições e cinco plantas por parcela. Os tratamentos que compuseram esse estudo foram: T1 (ASM, 0,5 mg.mL⁻¹), T2 (Calda Bordalesa 1%), T3 (Controle); T4 (Filtrado não autoclavado do sapróbio *Stachlidium bicolor*, 20%) e T5 (Filtrado autoclavado do sapróbio *S. bicolor*, 20%).

A escolha do cultivar Cordillera (Feltrin®) foi baseada no trabalho de Santos Neto(2012). Essa cultivar possui hábito de crescimento indeterminado, produz frutos tipo italiano, bilocular, com resistência e/ou tolerância a: Vira-Cabeça do tomateiro (TSWV); Vírus do Mosaico do Tabaco (TMV); Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV); Verticillium (*Verticillium albo-atrum* e *Verticillium dahliae*); *Fusarium oxysporum* raça 2; e nematóides (*Meloidogyne incognita* e *M. javanica*).

As sementes de tomate cv. Cordillera foram semeadas em bandejas de isopor de 128 células contendo substrato comercial para produção de mudas de hortaliças em casa de vegetação. Ao atingirem 10 a 12 cm de altura (25 dias após semeadura), as mudas foram transplantadas para o campo, O transplântio foi realizado em camalhões, com espaçamento de 1,2 m entre linhas e 0,70 m entre plantas. O sistema de condução foi com barbantes de uma guia. O plantio foi realizado em consórcio com cultura do coentro (*Coriandrum sativum*), para diminuir a incidência de pragas (TOGNI et al., 2009; TOGNI et al., 2010). Quanto aos demais tratos culturais, foram realizadas capinas manuais periódicas para o controle de plantas espontâneas. A desbrota e o tutoramento foram realizados semanalmente e para obter frutos com padrão comercial cada racemo foi raleado, deixando-se oito frutos nos dois primeiros e seis frutos no restante.

Os tratamentos foram pulverizados sobre a cultura até o ponto de saturação, em intervalos quinzenais. A concentração dos elicitores utilizada foi à mesma utilizada no experimento em casa de vegetação.

As avaliações consistiram em determinar a qualidade pós-colheita dos frutos. Para a avaliação físico-química, os frutos utilizados na pesquisa foram lavados apenas com água corrente, em seguida mensurou-se (a) o teor de sólidos solúveis totais (SST), (b) pH, (c) acidez total titulável (ATT%), (d) massa e volume (cm³) e (e) Relação SST/ATT Ratio. Para o preparo das amostras nas avaliações químicas, utilizou-se três frutos, que foram homogeneizados com mixer (WALITA® RI6720) para a obtenção do suco.

- (a) Teor de sólidos solúveis totais (SST): determinado por refratometria, através de refratômetro de bancada, sendo que o suco dos frutos submetidos aos diferentes tratamentos foi homogeneizado e transferido de uma a duas gotas para o prisma do refratômetro, de acordo com as normas da “Association of Official Analytical Chemists” - AOAC (1995). Os resultados foram expressos em °Brix.
- (b) pH: utilizou-se o suco dos frutos submetidos aos diferentes tratamentos e a determinação do pH foi realizada de modo direto, por meio de pHmêtro digital (TECNAL TEC-5). Os resultados foram expressos em unidades de pH (AOAC, 1995).
- (c) Acidez titulável total (ATT): para determinação da acidez titulável total, 10 mL do suco foram transferidas para Erlenmeyer de 250 mL e o volume completado até 100 mL com água destilada. Esta solução foi titulada com solução padrão de hidróxido de sódio 0,1 M, de acordo com metodologia do Instituto Adolfo Lutz (1985).

$$\text{Acidez total (\%)} = (V \times N \times f \times F \times 100)/P$$

Em que: V (mL) = volume de NaOH gasto na titulação até pH 8,1; f = fator de correção da solução de NaOH; F = fator do ácido cítrico (0,06404); P = volume da amostra (10mL); e N = normalidade da solução de NaOH (0,1 M)

- (d) A massa foi avaliada por pesagem em balança digital (SHIMADZU® BL3200H, precisão de 0,01g) e o volume dos frutos obtidos pela metodologia descrita por Moraes et al.(2004).
- (e) Relação SST/ATT (Ratio): calculada pelo quociente da relação entre sólidos solúveis totais e acidez titulável total (SST/ATT).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e teste de médias (Scott-Knott $p < 0,05$) utilizando-se o programa Sisvar versão 5.3 (FERREIRA, 2011).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Crescimento micelial dos sapróbios em diferentes meios

Na Tabela 1, encontram-se as médias do crescimento micelial dos fungos sapróbios *S. bicolor*, *P. hispidula*, *B. pulchra*, *M. leucotrichum* e *D. tetraseriale*, em dois diferentes meios de cultura. O meio de cultura MCA demonstrou menor efeito na média do crescimento micelial, proporcionando as menores médias de crescimento. As médias proporcionadas pelo meio BDA foram significativamente maiores, com exceção para o sapróbio *D. tetraseriale*.

Na Figura 4 está o desenvolvimento dos sapróbios, revelando também diferenças morfológicas visíveis quando são submetidos a diferentes meios de cultura.

Tabela 1. Médias de crescimento micelial dos diferentes sapróbios em dois meios de cultura: MCA (Milho-Cenoura-Ágar) e BDA (Batata-Dextrose-Ágar).

| Tratamentos | Crescimento micelial (cm) | |
|-----------------------------------|---------------------------|--------|
| | MCA | BDA |
| <i>Stachylidium bicolor</i> | 0,66 a* | 1,24 b |
| <i>Periconia hispidula</i> | 2,90 a | 3,26 d |
| <i>Brachysporiella pulchra</i> | 0,3 a | 0,56 a |
| <i>Myrothecium leucotrichum</i> | 1,6 a | 1,88 c |
| <i>Dictyosporium tetraseriale</i> | 1,5 a | 1,30 b |
| CV% | 18,47 | 6,81 |

*Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott(p<0,05).

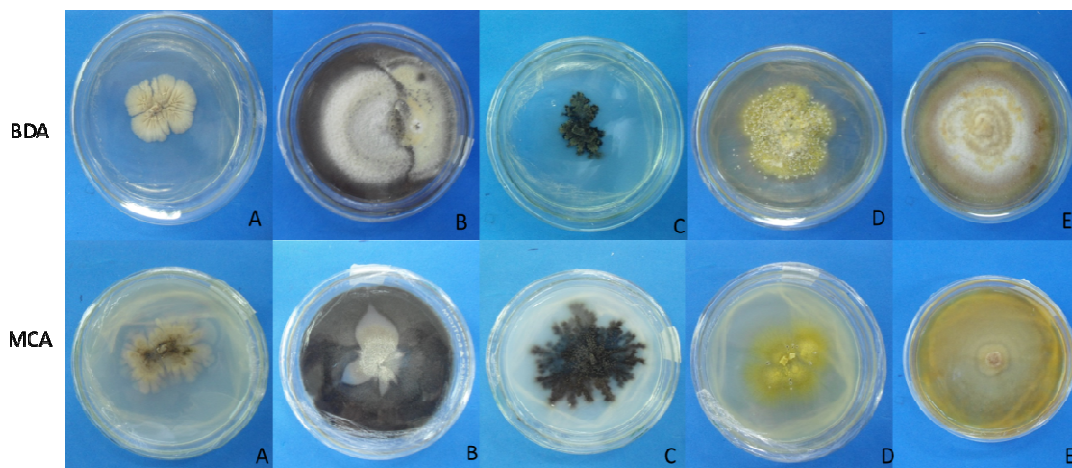


Figura 4. Desenvolvimento dos fungos sapróbios em diferentes meios de cultura. A. *Stachylidium bicolor*; B. *Periconia hispidula*; C. *Brachysporiella pulchra*; D. *Myrothecium leucotrichum*; E. *Dictyosporium tetraseriale*.

Assim, em alguns experimentos *in vitro* optou-se pela utilização do meio BDA, visto que o fitopatógeno também mostra maior crescimento micelial quando neste meio (FANCELLI, 1991).

4.2. Teste de antagonismo

No confronto direto dos sapróbios com *A. solani* notou-se que os isolados *B. pulchra*, *M. leucotrichum*, *D. tetraseriale* e o *P. sanguineus* inibiram o crescimento micelial do fitopatógeno, respectivamente em 33,04%, 35,07%, 33,34% e 48,11%, quando em meio BDA. Já, quando confrontados em meio MCA, os mesmo fungos também proporcionaram diferença significativa quanto ao controle, inibindo em 14,50%, 22,30%, 7,8% e 26,95% o crescimento micelial do fungo desafiante (Tabela 2).

Tabela 2. Teste de antibiose de isolados de fungos sapróbios em confrontação direta com *Alternaria solani*, em meio de cultura BDA e MCA, avaliando o crescimento micelial.

| Tratamentos | Crescimento micelial de <i>A. solani</i> (cm) | |
|-------------------------------------|---|--------|
| | BDA | MCA |
| <i>Alternaria solani</i> (Controle) | 6,9 c* | 5,38 e |
| <i>Stachylidium bicolor</i> | 6,66 c | 5,36 e |
| <i>Periconia hispidula</i> | 6,4 c | 5,46 e |
| <i>Brachysporiella pulchra</i> | 4,62 b | 4,60 c |
| <i>Myrothecium leucotrichum</i> | 4,48 b | 4,18 b |
| <i>Dictyosporium tetraseriale</i> | 4,60 b | 4,96 d |
| <i>Pycnopus sanguineus</i> | 3,58 a | 3,93 a |
| CV% | 9,22 | 4,93 |

*Médias seguidas de mesma letra, na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott($p < 0,05$).

O fungo *M.leucotrichum*, foi o único a formar halo de inibição, quando em meio BDA. Este halo de inibição teve duração de 3-4 dias, seguido de posterior crescimento do fungo sapróbio (Figura 5). Após 25 dias, o sapróbio *M.leucotrichum* desenvolveu sobre o patógeno, indicando hiperparasitismo. O mesmo foi evidenciado com *P. sanguineus*, que também apresentou potencial hiperparasita, desenvolvendo-se sobre o patógeno desafiante (Figura 6).

Pesquisas revelam o potencial antagonico de microrganismos e extratos naturais sobre fitopatógenos. Bonfim et al. (2010) observaram que isolados de *Trichoderma* spp. apresentaram rápido crescimento micelial em BDA e com apenas três dias de incubação, os antagonistas já inibiram o desenvolvimento de *Rhizopus stolonifer*. Fialho et al. (2004) avaliando a eficácia da actinobactéria *Nocardioides thermolilacinus*, estirpe SON-17, *in vitro* contra *A. solani*, *Corynespora cassiicola*, *Phytophthora infestans*, verificaram que estirpe SON-17 inibiu a germinação de esporos fúngicos.

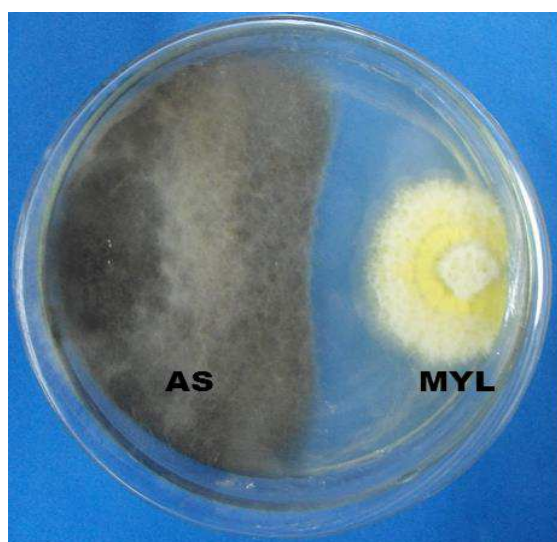


Figura 5. Halo de inibição formado no confronto direto do sapróbio *Myrothecium leucotrichum* (MYL) com *Alternaria solani* (AS).

Marba et al. (2012), também estudando fungos sapróbios do semiárido nordestino, verificaram que fungos sapróbios apresentaram variação quanto à atividade antifúngica, *in vitro*, contra *Colletotrichum gloeosporioides*, sendo os isolados *Stachybotrys globosa*, *Stachybotrys nephrosfora*, *Gonytrichum macrocladume*

Memnoniella echinata, os mais promissores, chegando a exercer inibição no crescimento micelial do patógeno por pareamento. Outro exemplo é o estudo de Brandão et al. (2013), que observaram que os fungos sapróbios *Memnoniella echinata*, *Stachybotrys globosa*, *Stachybotrys nephrosfora*, possuem potencial como agentes de controle biológico contra *Phytophthora nicotianae*.

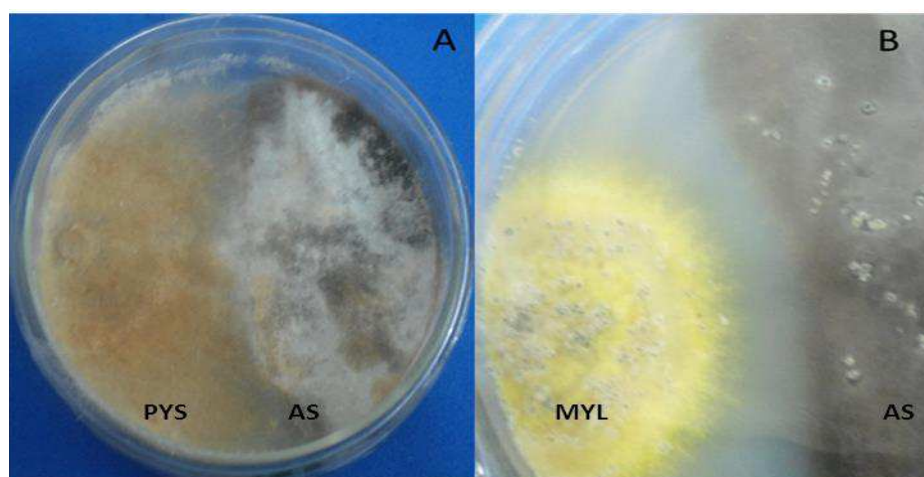


Figura 6. A. Detalhes de hiperparasitismo entre *Pycnoporus sanguineus* (PYS) e *Alternaria solani*(AS); B. Esporos de *Myrothecium leucotrichum* (MYL) desenvolvidos sobre micélio *Alternaria solani*(AS).

De acordo com as avaliações em cultivo pareado, baseando-se na escala de Bell et al. (1982), apenas o fungo *P. sanguineus* apresentou maior crescimento, ocupando pelo menos 3/3 da superfície do meio (nota=3) em ambos meios de cultura. Já o fungo *M. leucotrichum* apresentou resultado semelhante apenas quando pareado em meio BDA (Tabela 3).

Auler et al. (2003) estudando o potencial de 23 isolados de *Trichoderma harzianum* provenientes de solo de Cerrado como agente de controle biológico de *Sclerotinia rolfsii*, importante patógeno nas culturas do feijoeiro e soja, baseando-se na escala de Bell et al. (1982), verificaram que 23 isolados de *T. harzianum* estudados, 13 (CEN140, CEN141, CEN153, CEN154, CEN155, CEN156, CEN158, CEN167, CEN169, CEN170, CEN192, CEN194 e CEN197) apresentaram maior crescimento, ocupando pelo menos 2/3 da superfície do meio (notas ≤ 2), diferente do que foi observado neste trabalho, dos 5 sapróbios analisados, 4 (*S. bicolor*, *P. hispidula*, *B. pulchra* e *D. tetraseriale*) apresentaram menor crescimento micelial (notas ≥ 4), em ambos meios de cultura estudados.

Tabela 3- Médias das notas do teste de confrontação direta obtidas pelos sapróbios contra *Alternaria solani* utilizando a escala de Bell et al. (1982) em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA) e Milho-Cenoura-Ágar (MCA).

| Tratamentos | Escala de nota | |
|-----------------------------------|----------------|-------|
| | MCA | BDA |
| <i>Stachylidium bicolor</i> | 5,0 c* | 5,0 c |
| <i>Periconia hispidula</i> | 4,0 b | 4,0 b |
| <i>Brachysporiella pulchra</i> | 5,0 c | 5,0 c |
| <i>Myrothecium leucotrichum</i> | 3,8 b | 3,1 a |
| <i>Dictyosporium tetraseriale</i> | 4,0 b | 4,0 b |
| <i>Pycnoporus sanguineus</i> | 3,0 a | 3,0 a |
| CV% | 4,60 | 2,66 |

*Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

4.3. Crescimento micelial de *Alternaria solani* em filtrados dos fungos sapróbios

Na Tabela 4, estão os resultados de inibição do crescimento micelial de *A. solani* quando submetida às diferentes concentrações dos filtrados dos sapróbios. O tratamento com filtrado de *M. leucotrichum*, nas concentrações 10, 15 e 20% diferiu estatisticamente dos demais tratamentos, inibindo o crescimento em 28,9%; 27,4% e 32,6%, respectivamente. Os demais tratamentos não diferiram do controle.

Tabela 4. Crescimento micelial (cm) de *Alternaria solani* em diferentes concentrações de filtrados dos fungos sapróbios, em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA).

| Tratamentos | Concentração (%) | | | |
|---------------------------------|------------------|--------|--------|--------|
| | 5 | 10 | 15 | 20 |
| <i>Stachylidium bicolor</i> | 5,12 a | 5,10 a | 5,38 a | 5,10 a |
| <i>Periconia hispidula</i> | 5,36 a | 4,98 a | 5,20 a | 4,86 a |
| <i>Brachysporiella pulchra</i> | 4,98 a | 5,06 a | 5,10 a | 5,58 a |
| <i>Myrothecium leucotrichum</i> | 4,84 a | 4,06 b | 4,18 b | 3,88 b |
| <i>Pycnoporus sanguineus</i> | 5,32 a | 5,70 a | 5,60 a | 4,98 a |
| Controle | 5,76 a | 5,76 a | 5,76 a | 5,76 a |
| CV% | 8,26 | 8,26 | 8,26 | 8,26 |

* Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott($p < 0,05$).

O sapróbio *M. leucotrichum* se destaca, revelando potencial como agente no controle biológico do agente causal da pinta preta em tomateiro. Calvo et al. (2012), avaliando fungos sapróbios (*Stachybotrys globosa*, *Gonytrichum chlamydosporium*, *Volutella mínima*, *Curvularia eragrostidis* e *Lappodochium lageniforme*) com potencial de controle *in vitro* de *Xanthomonas vesicatoria* observaram que o filtrado centrifugado do sapróbio *Curvularia eragrostidis*, incorporado em meio nutriente-ágar, nas proporções de 0,2% (v/v) inibiu o crescimento da *X. vesicatoria* em 36,1%, enquanto que o filtrado centrifugado do sapróbio *Volutella minima* causou a maior inibição (50%) a 2% indicando que provavelmente, esses fungos produzem metabólitos com potencial de controle da bactéria patogênica.

P. sanguineus também demonstrou potencial como agente no controle biológico, isto já foi evidenciado por Viecelli et al. (2010) que verificaram o efeito das concentrações do extrato esterilizado por filtração do micélio de *P. sanguineus* sobre o crescimento micelial, a germinação e esporulação de *Pseudocercospora griseola*.

4.4. Compostos voláteis

Não foi verificada produção de compostos voláteis capazes de reduzir o crescimento vegetativo do fitopatógeno, nos meios de cultura estudados (Figura 7). Tonucci (2004) também verificou que os compostos voláteis produzidos por *Lentinula edodes* não demonstraram efeito inibitório no crescimento micelial e germinação de conídios de *A. solani*.

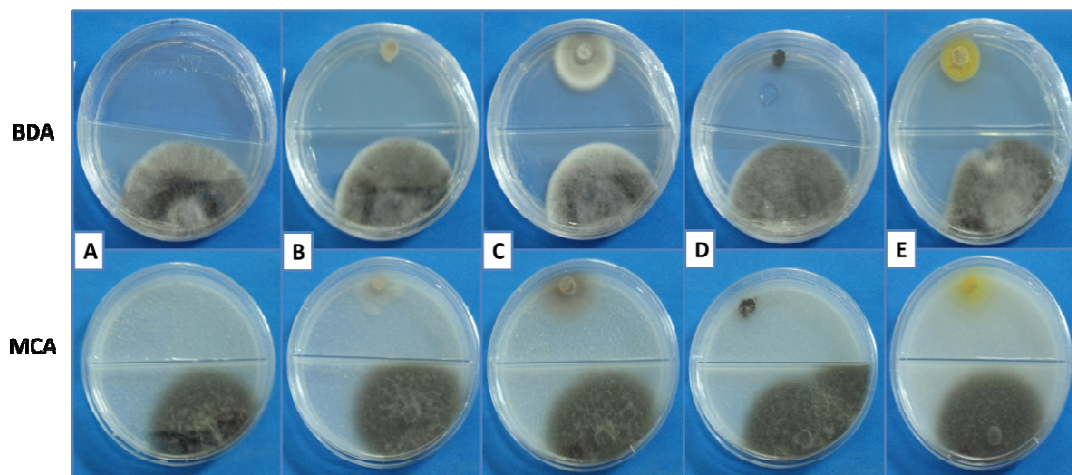


Figura 7. Produção de compostos voláteis dos sapróbios em diferentes meios de cultura. A. *Stachylidium bicolor*; B. *Periconia hispidula*; C. *Brachysporiella pulchra*; D. *Myrothecium leucotrichum*; E. *Dictyosporium tetraseriale*.

Ao contrário dos resultados acima, Botrel (2013) observou produção de compostos voláteis do fungo sapróbio *Phialomyces macrosporium*, tanto em meio BDA quanto no meio MCA, quando inoculado dois dias antes do fitopatógeno *Pseudomonas syringae* pv *garcae*.

Fialho (2004) verificou que linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* produziram compostos voláteis capazes de inibir o crescimento vegetativo do fitopatógeno em até 59% (linhagem CR-1). Bruce et al (2003) verificaram que compostos voláteis produzidos por *S. cerevisiae* em meio triptona de soja foram capazes de inibir o crescimento de fungos que atacam madeira *Sclerophoma pithyophila* (75%), *Ophiostoma piliferum* (76%), *Botrydiplodia theobromae* (45%) e *Aureobasidium pullulans* (33%). Segundo os autores, a produção de voláteis é influenciada pelas condições nutricionais do meio de cultivo utilizado, pois em meio de malte e em meio pobre em nutrientes esta inibição foi de modo geral baixa ou nula.

4.5. Controle da pinta preta do tomateiro em casa de vegetação

De acordo com a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), obtida das avaliações nas 3ª e 4ª folhas tratadas (Tabela 5), observou-se redução na severidade nos tratamentos com o filtrado de *Stachylidium bicolor* e ASM. O *S. bicolor* e o ASM proporcionaram redução da severidade na 3ª folha de 80,15% e 57,2%, respectivamente, porém não diferiram estatisticamente do controle negativo (água). Os filtrados *Periconia hispidula*, *Brachysporiella pulchra*, *Myrothecium leucotrichum* e *Pycnoporys sanguineus* não diferiram significativamente entre si e induziram suscetibilidade a doença, aumentando a AACPD em 73%, 137,4%, 96,6% e 132,3%, respectivamente, em relação ao controle água.

Tabela 5. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para pinta preta na 3ª e 4ª folha do tomateiro em função do tratamento com filtrados de fungos sapróbios na concentração 20%, 3 dias antes da inoculação. Maringá, PR.

| Tratamentos | AACPD | |
|--------------------------------|----------|----------|
| | 3ª folha | 4ª folha |
| Controle negativo (água) | 69,86 a* | 66,16 d |
| <i>Stachylidium bicolor</i> | 13,47 a | 2,56 g |
| <i>Periconia hispidula</i> | 120,55 b | 88,78 c |
| <i>Brachysporiella pulchra</i> | 165,82 b | 144,59 a |

| | | |
|---------------------------------|----------|----------|
| <i>Myrothecium leucotrichum</i> | 137,34 b | 42,44 e |
| <i>Pycnoporys sanguineus</i> | 162,24 b | 126,95 b |
| ASM | 29,6 a | 5,11 f |
| CV% | 33,64 | 17,91 |

*Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de teste de Scott-Knott (p<0,05).

Na análise da 4ª folha, todos os tratamentos diferiram entre si, destacando-se tratamentos com filtrado do *S. bicolor* (com redução de cerca de 96%), o ASM, (reduzindo a severidade em 92,3%) e o filtrado de *M. leucotrichum* (redução de 35,8%) quando comparados com o controle água. Os filtrados de *P. hispidula*, *B. pulchrae* *P. sanguineus* novamente induziram suscetibilidade.

No ensaio em casa de vegetação, observou-se que os tratamentos *S. bicolor*, *M. leucotrichum* e o indutor ASM foram superiores aos demais tratamentos, reduzindo a AACPD.

Botrel et al. (2012) avaliando o efeito de fungos sapróbios na severidade da mancha aureolada pulverizaram mudas de café com sintomas da doença com inóculo de *Memnoniella levispora* (1×10^5 ufc/mL) e *Memnoniella echinata* (7×10^4 ufc/mL) e verificaram que os dois fungos sapróbios apresentam potencial para conter o progresso da mancha aureolada em mudas, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, reduzindo a AACPD (18-28%).

Assim como neste estudo, Cavalcanti et al. (2004) também relataram a eficácia do ASM como indutor de resistência em plântulas de cacaueteiro contra a murcha de *Verticillium* apresentando redução de até 55,4 % na severidade da doença. Plantas de tomateiro cv. Santa Cruz Kada pulverizadas com acibenzolar S-metil (ASM) e inoculadas com um isolado patogênico de *Xanthomonas vesicatoria* promoveram 47,7% de proteção contra a doença (CAVALCANTI et al., 2006).

Ao contrário dos resultados obtidos neste trabalho, Viecelli (2008) avaliando o controle de *Pseudocercospora griseola*, constatou que em plantas de feijão tratadas com filtrado de *P. sanguineus*, nas concentrações 10 e 20%, houve uma redução na severidade de 82,4 % e 77%, respectivamente. Assi (2005), também relata que os extratos aquosos de basidocarpos de *P. sanguineus* reduziram a severidade da antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) em feijoeiro de forma sistêmica.

4.6. Análises bioquímicas

4.6.1. Atividade peroxidase de guaiacol

A análise da atividade de peroxidase mostrou que todos os tratamentos no tempo 0, apresentaram médias maiores que o controle água. Nas 24 e 48 horas pós-inoculação (hpi), todos os tratamentos apresentaram médias maiores de atividade, com exceção do filtrado *P. sanguineus*, e essa inibição foi verificada nos horários subsequentes. Apenas *S. bicolor*, apresentou diferença estatística em relação ao controle água, ao controle positivo ASM e aos demais tratamentos, nas 120 hpi (Tabela 6).

Tabela 6. Atividade de peroxidase (Abs.min⁻¹mg⁻¹proteína)em folhas de tomate tratadas com filtrado de fungos sapróbios na concentração de 20%. Maringá –PR.

| TRATAMENTOS | Abs.min ⁻¹ mg ⁻¹ proteína | | | | | |
|---------------------------------|---|--------|---------|--------|--------|---------|
| | 0 hpi | 24 hpi | 48 hpi | 72 hpi | 96 hpi | 120 hpi |
| <i>Stachilidium bicolor</i> | 2,33 a | 3,24 a | 2,24 a | 2,88 a | 2,68 a | 3,89 b |
| <i>Periconia hispidula</i> | 1,97 a | 2,26 a | 1,67 a | 2,29 a | 1,99 a | 1,88 a |
| <i>Brachysporiella pulchra</i> | 1,55 a | 2,74 a | 4,94 a | 2,24 a | 2,30 a | 1,81 a |
| <i>Myrothecium leucotrichum</i> | 1,60 a | 2,41 a | 1,934 a | 2,15 a | 2,31 a | 2,71 a |
| <i>Pycnoporus sanguineus</i> | 1,60 a | 1,71 a | 3,07 a | 1,89 a | 1,85 a | 2,13 a |
| ASM | 1,54 a | 2,94 a | 1,87 a | 2,19 a | 2,57 a | 2,72 a |
| CONT. | 0,94 a | 1,89 a | 1,57 a | 2,43 a | 2,05 a | 2,23 a |
| CV% | 48,98 | 32,26 | 92,74 | 32,52 | 24,10 | 28,53 |

CONT= controle (água); ASM= acibenzolar-S-metil (0,5 mg i.a.mL⁻¹)

hpi=horas pós-inoculação

*Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de teste de Scott-Knott (p<0,05).

Na maioria dos tempos pós-inoculação, a atividade da peroxidase do guaiacol não foi expressiva (Tabela 6), não diferindo do controle, com exceção do horário 120 hpi onde nota-se diferença significativa de atividade entre plantas tratadas com *S. bicolor* e os demais tratamentos. Níveis altos de POX também foram detectados em plantas de feijão tratadas com *Phialomyces macrosporus*, aos sete dias após inoculação. (BOTREL, 2013).

Alguns trabalhos descrevem que o aumento na atividade da peroxidase é parte da fase geral de ativação do metabolismo, que sintetiza de novo esta enzima (KANAZAWA et al., 1965; FLEURIET & DELOIRE, 1982). Esta reação ocorre rapidamente nas células infectadas, com estímulo do metabolismo das células vizinhas, organizando e estabelecendo um efetivo sistema de defesa pela planta em direção à área do ferimento. Em geral, as células mais próximas da área do ferimento são envolvidas (FLEURIET & DELOIRE, 1982). Este fato pode estar relacionado com os resultados de AACPD evidenciados pelo tratamento *S. bicolor*.

A atividade de peroxidase tem sido implicada em uma variedade de processos relacionados com a defesa das plantas, incluindo reação de hipersensibilidade, lignificação e suberização. Nas plantas em geral, como por exemplo, em tomate, a peroxidase é uma das enzimas envolvidas no último passo na lignificação. O reforço da parede celular da planta por lignina e compostos fenólicos, aumenta a resistência da planta à degradação enzimática por patógenos e atua como barreira mecânica ao ingresso de toxinas, bem como a penetração física (NICHOLSON & HAMMERSCHMIDT, 1992).

4.6.2. Atividade de polifenoloxidase

Quanto à atividade da polifenoloxidase, não houve diferença estatística entre os tratamentos (Tabela 7). Contudo, o tratamento com ASM proporcionou médias de atividade maiores que o controle em todos os horários, com destaque para o horário 96 hpi.

Os tratamentos com filtrados os *S. bicolor*, *P. hispidula*, *B. pulchra*, *M. leucotrichum* e *P. sanguineus* também apresentaram médias de atividade maiores que o controle e o ASM no horário 120 hpi.

Tabela 7. Atividade de polifenoloxidase (Abs.min⁻¹mg⁻¹proteína) em folhas de tomate tratadas com filtrado de fungos sapróbios na concentração de 20%. Maringá, PR.

| TRATAMENTOS | Abs.min ⁻¹ mg ⁻¹ proteína | | | | | |
|---------------------------------|---|--------|--------|--------|--------|---------|
| | 0 hpi | 24 hpi | 48 hpi | 72 hpi | 96 hpi | 120 hpi |
| <i>Stachilidium bicolor</i> | 1,85 a | 1,83 a | 0,93 a | 1,49 a | 2,18 a | 2,89 a |
| <i>Periconia hispidula</i> | 1,69 a | 1,35 a | 1,25 a | 1,81 a | 2,31 a | 1,89 a |
| <i>Brachysporiella pulchra</i> | 1,73 a | 2,18 a | 1,59 a | 2,58 a | 2,72 a | 2,29 a |
| <i>Myrothecium leucotrichum</i> | 1,41 a | 1,89 a | 1,77 a | 1,85 a | 2,40 a | 2,71 a |
| <i>Pycnoporys sanguineus</i> | 1,58 a | 1,48 a | 2,43 a | 2,06 a | 2,08 a | 2,70 a |
| ASM | 1,77 a | 2,69 a | 1,78 a | 2,52 a | 3,03 a | 1,94 a |
| CONT. | 0,99 a | 1,88 a | 1,68 a | 2,07 a | 2,84 a | 1,89 a |
| CV% | 44,11 | 27 | 48,51 | 42,20 | 21,15 | 50,89 |

CONT= controle (água); ASM= acibenzolar-S-metil (0,5 mg.mL⁻¹)

hpi=horas pós-inoculação

*Médias seguidas de mesma letra, na coluna não diferem entre si pelo teste de teste de Scott-Knott (p<0,05).

A atividade específica da polifenoloxidase expressa na Tabela 7 mostra que não houve indução de atividade em função dos tratamentos, pois não diferiram do controle água. No entanto, observa-se um incremento na atividade pelo tratamento ASM em todos os horários.

Silva et al. (2007), avaliando o efeito dos extratos aquosos dos cogumelos *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* e do indutor de resistência acibenzolar-S-metil (ASM) no controle da murcha bacteriana em tomate e o modo de ação destes produtos na atividade protetora, através de alterações na atividade de determinadas enzimas, também constataram que as atividades de quitinase, fenilalanina amônia-liase e polifenoloxidase não foram alteradas para a maioria dos tratamentos, como evidenciado neste trabalho.

Já Pereira et al. (2008) avaliando o potencial de extratos fúngicos e vegetais na redução da murcha-de-verticílio do cacauzeiro, as atividades da peroxidase e polifenoloxidase e o conteúdo de lignina, verificaram que o ASM reduziu a murcha-de-verticílio em 38,0% e que, em plantas pulverizadas com ASM ou filtrado do micélio de *Rhizopus sp.*, seguidas de inoculação aumentaram a atividade de polifenoloxidase aos quatro dias após a pulverização. O mesmo foi evidenciado por Cavalcanti et al. (2006) que a partir da pulverização de ASM e Ecolife® em plantas de tomateiro, observaram aumentos na atividade da enzima polifenoloxidase e peroxidase.

4.6.3. Atividade da catalase

A Tabela 8 demonstra a dinâmica da atividade da catalase. Não houve diferença significativa entre os tratamentos até 72 hpi. Somente no horário 96 hpi, a atividade da catalase dos tratamentos *P. hispidula*, *B. pulchra*, *P. sanguineus* e ASM foi significativamente maior que o controle.

Tabela 8. Atividade de catalase (Abs.min⁻¹mg⁻¹proteína) em folhas de tomate tratadas com filtrado de fungos sapróbios na concentração de 20%. Maringá-PR.

| TRATAMENTOS | Abs.min ⁻¹ mg ⁻¹ proteína | | | | | |
|---------------------------------|---|----------|----------|----------|----------|----------|
| | 0 hpi | 24 hpi | 48 hpi | 72 hpi | 96 hpi | 120 hpi |
| <i>Stachilidium bicolor</i> | 10,554 a | 10,540 a | 8,217 a | 9,122 a | 6,244 a | 12,534 b |
| <i>Periconia hispidula</i> | 13,180 a | 8,666 a | 9,203 a | 10,610 a | 11,796 b | 6,431 a |
| <i>Brachysporiella pulchra</i> | 13,156 a | 11,444 a | 22,807a | 11,770 a | 11,867 b | 12,970 b |
| <i>Myrothecium leucotrichum</i> | 12,074 a | 10,859 a | 5,642 a | 7,143 a | 7,270 a | 13,222 b |
| <i>Pycnoporys sanguineus</i> | 11,995 a | 8,023 a | 11,108 a | 6,837 a | 9,911 b | 14,088 b |
| ASM | 11,436 a | 11,892 a | 6,762 a | 8,567 a | 10,587 b | 9,379 a |
| CONT. | 11,391 a | 10,253 a | 6,700 a | 8,658 a | 8,485 a | 11,167 b |

| | | | | | | |
|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| CV% | 40,89 | 25,38 | 92,23 | 38,60 | 19,10 | 24,21 |
|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|

CONT= controle (água); ASM= acibenzolar-S-metil (0,5 mg.mL⁻¹)

hpi=horas pós-inoculação

*Médias seguidas de mesma letra, na coluna não diferem entre si pelo teste de teste de Scott-Knott (p<0,05).

As maiores atividades foram detectadas nas 120 hpi, com plantas tratadas com os filtrados de *P. sanguineus* e *M. leucotrichum*. As menores médias de atividade foram observadas nas plantas tratadas com o filtrado de *P. hispidulae* com o ASM, também nas 120 hpi.

Neste presente trabalho, a atividade de CAT (Tabela 8) não mostrou comportamento diferencial entre tratamentos nem aumentos destacáveis ao longo da avaliação, com exceção do horário 96 hpi, para os tratamentos *P. hispidula*, *B. pulchra*, *P. sanguineus*, diferindo significativamente do controle água.

A catalase (CAT) catalisa a reação de dismutação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, reduzindo, dessa forma, o excesso de ERO's durante o estresse oxidativo.

O que pode ocorrer em tecidos infectados é uma redução da atividade da catalase resultando no acúmulo de peróxido de hidrogênio, favorecendo os eventos relacionados à reação de hipersensibilidade, que pode provocar a morte celular, e impedir o avanço do patógeno (MARGIS-PINHEIRO et al., 1999).

4.6.4. Atividade da β -1,3-glucanase

A análise da atividade de β -1,3-Glucanase(Tabela 9) revela que nos tempos 0, 24, 48, 72 e 96 hpi, as plantas tratadas com *B. pulchra* apresentaram maiores atividades da enzima quando comparadas com os demais tratamentos, porém não diferiram estatisticamente do controle. Já no horário 120 hpi, a atividade foi significativamente maior nas plantas tratadas com filtrados dos sapróbios *S. bicolor*, *B. pulchra* e *P. sanguineus*. Resultados semelhantes foram obtidos por Toillier et al. (2010) que observaram que na 2ª folha apenas inoculada, a expressão da atividade β -1,3-glucanasefoi maior somente aos 9 DAT com o extrato de basidiocarpo a 10%, superior a água em 1200%, e o filtrado de cultura a 10% foi superior à testemunha água em 100%.

Tabela 9. Atividade da β -1,3-Glucanase (mg glicose.min⁻¹mg⁻¹proteína) em folhas de tomate tratadas com filtrado de fungos sapróbios na concentração de 20%. Maringá, PR.

| TRATAMENTOS | mg glicose.min ⁻¹ mg ⁻¹ proteína | | | | | |
|---------------------------------|--|---------|---------|--------|--------|---------|
| | 0 hpi | 24 hpi | 48 hpi | 72 hpi | 96 hpi | 120 hpi |
| <i>Stachilidium bicolor</i> | 8,88 a | 4,25 a | 6,48 a | 6,22 a | 3,25 a | 8,07 b |
| <i>Periconia hispidula</i> | 10,56 a | 3,79 a | 7,12 a | 6,80 a | 7,22 a | 4,18 a |
| <i>Brachysporiella pulchra</i> | 11,79 a | 10,16 a | 19,56 a | 7,42 a | 8,24 a | 7,39 b |
| <i>Myrothecium leucotrichum</i> | 10,62 a | 7,03 a | 5,28 a | 4,92 a | 3,81 a | 4,81 a |
| <i>Pycnoporys sanguineus</i> | 11,51 a | 3,49 a | 14,72 a | 4,29 a | 5,42 a | 7,02 b |
| ASM | 9,14 a | 4,04 a | 4,99 a | 4,92 a | 5,47 a | 3,17 a |
| CONT. | 7,63 a | 1,71 a | 4,19 a | 5,10 a | 4,42 a | 1,96 a |
| CV% | 46,64 | 105,76 | 106,81 | 41,37 | 49,59 | 45,42 |

CONT= controle (água); ASM= acibenzolar-S-metil (0,5 mg.mL⁻¹)

hpi=horas pós-inoculação

*Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de teste de Scott-Knott (p<0,05).

Para outros patossistemas e indutores, também têm-se verificado incrementos na atividade dessa enzima. Kuhn (2007) observou, em feijoeiros tratados com *Bacillus cereus*, o aumento não significativo da atividade específica de β -1,3 glucanase, enquanto que o indutor abiótico ASM, diferente do resultado deste trabalho, aumentou significativamente a atividade dessa enzima. Guarda et al. (2007) observaram aumento da atividade de glucanase em plantas de feijão tratadas com quitosana e inoculadas com *C.lindemuthianum*. Fiori-Suzuki et al. (2008) verificaram aumento da atividade de β -1,3 glucanases em maracujazeiros inoculados com *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* e tratados com extratos de basidiocarpos de *L. edodes* e *A. blazei* nas concentrações 20 e 40%.

4.6.5. Atividade da lipoxigenase

A análise da lipoxigenase (Tabela 10) mostra que nos horários 0, 48 e 72 hpi, não houve diferença significativa entre os tratamentos. No horário 24 hpi, os tratamentos *S. bicolor*, *P. hispidula*, *M. leucotrichum* e ASM induziram a atividade da enzima. No entanto, no horário 96 hpi, estes mesmos tratamentos, incluindo o *P. sanguineus* não diferiram do controle água e o *M. leucotrichum* reduziu

significativamente a atividade da lipoxigenase. Já o tratamento *P. hispidula*, induziu a atividade, sendo superior em 47% que o controle água.

Tabela 10. Atividade da lipoxigenase(Mmol hid.min⁻¹mg⁻¹proteína)em folhas de tomate tratadas com filtrado de fungos sapróbios na concentração de 20%. Maringá, PR.

| TRATAMENTOS | Mmol hid.min ⁻¹ mg ⁻¹ proteína | | | | | |
|---------------------------------|--|--------|---------|--------|--------|---------|
| | 0 hpi | 24 hpi | 48 hpi | 72 hpi | 96 hpi | 120 hpi |
| <i>Stachilidium bicolor</i> | 3,34 a | 4,86 b | 3,05 a | 3,89 a | 3,24 b | 7,59 b |
| <i>Periconia hispidula</i> | 4,24 a | 3,65 b | 3,22 a | 5,26 a | 6,68 c | 4,21 a |
| <i>Brachysporiella pulchra</i> | 6,18 a | 1,45 a | 10,01 a | 5,27 a | 5,52 b | 7,34 b |
| <i>Myrothecium leucotrichum</i> | 3,81 a | 4,60 b | 1,94 a | 4,12 a | 3,32 a | 6,51 b |
| <i>Pycnoporus sanguineus</i> | 3,73 a | 2,54 a | 2,64 a | 3,19 a | 4,79 b | 7,10 b |
| BION | 3,84 a | 3,83 b | 2,67 a | 3,90 a | 4,79 b | 4,62 a |
| CONT. | 3,16 a | 2,11 a | 2,64 a | 3,92 a | 4,52 b | 5,80 a |
| CV% | 51,16 | 26,24 | 113,31 | 39,07 | 18,89 | 19,40 |

CONT= controle (água); ASM= acibenzolar-S-metil (0,5 mg.mL⁻¹)

pi=horas pós-inoculação

*Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de teste de Scott-Knott (p<0,05).

No horário 120 hpi, observou-se novamente que os tratamentos *S. bicolor*, *M. leucotrichum* incrementaram significativamente a atividade da lipoxigenase, bem como os filtrados de *B. pulchra* e *P. sanguineus*.

A lipoxigenase está envolvida na resposta a ferimento (Vieira et al., 2001), resistência a insetos e patógenos (Silva, 1999) entre outros processos. Silva et al. (2001) caracterizando a via das lipoxigenases em plantas de soja resistentes e susceptíveis a *Diaphorte phaseolorum* f.sp. *meridionalis*, agente causal do cancro-da-haste, observaram que os valores de atividade específica da lipoxigenase foram maiores nas plantas inoculadas com fungo e nas plantas injuriadas com palito sem inóculo.

Jardim (2009) verificou que nas plantas de maracujá tratadas com metil jasmonato, houve um aumento na indução de transcritos da lipoxigenase (indução de genes codificadores da enzima) a partir de 3 horas de exposição ao tratamento, com maior nível de indução após 12 horas de tratamento.

4.7. Teor de clorofila

Plantas tratadas com *S. bicolor* e *M. leucotrichum* incrementaram significativamente os teores de clorofila a, b e total quando comparados aos demais tratamentos e ao controle água (Figura 8).

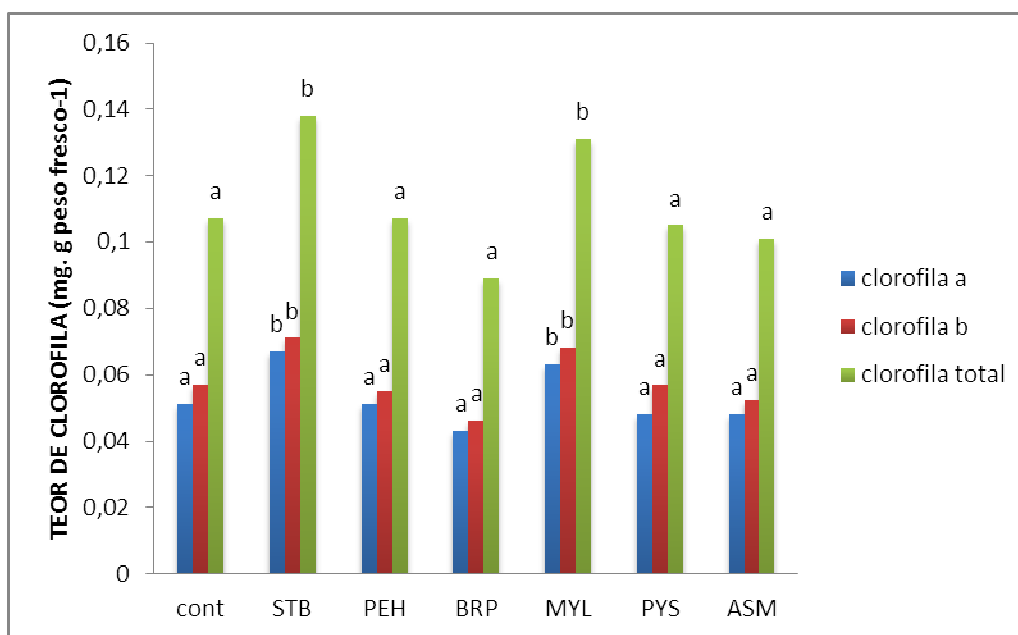


Figura 8. Teor de clorofila a, b e total em plantas de tomate. *Stachilidium bicolor* (STB); *Periconia hispidula* (PEH); *Brachysporiella pulchra* (BRP); *Myrothecium leucotrichum* (MYL); *Pycnoporus sanguineus*(PYS); CONT.=Água; ASM= Acibenzolar-S-metil (0,5mg.mL⁻¹). *Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de teste de Scott-Knott (p<0,05).

Em relação à clorofila a, os tratamentos com os filtrados de *S. bicolor* e *M. leucotrichum* proporcionaram um incremento de 31,4% e 23,5%, respectivamente. Os filtrados de *B. pulchra*, *P. sanguineus* e o indutor BION, reduziram os teores de clorofila a em 15,7%, 5,8% e 7,8%, respectivamente.

Os teores de clorofila b também aumentaram nas plantas tratadas com os filtrados de *S. bicolor* (24,6%) e *M. leucotrichum*(19,3%).

Diferente do resultado encontrado por Viecelli (2008) que observou que extratos em diferentes concentrações de *P. sanguineus* estimularam o conteúdo de clorofila a, b e total, neste trabalho o filtrado do *P. sanguineus* não diferiu da testemunha, reduzindo os teores de clorofila a, b e total.

Foi observado que alguns tratamentos proporcionaram efeito redutor dos teores desta molécula. Considerando que as moléculas de clorofila a e b constituem os dois sistemas de pigmentos responsáveis pela absorção e transferência de energia radiante (VIECELLI et al., 2008), os resultados sugerem menor produção de energia para síntese dos compostos de defesa da planta e maior para aqueles que incrementaram esses teores.

4.8. Biometria

O tratamento *Stachylidium bicolor* diferiu estatisticamente quanto ao controle água e demais tratamentos quanto à massa fresca da parte aérea produzida (incremento de 15,5%) e à altura de planta (incremento de 46,1%) (Tabela 11).

Tabela 11. Massa fresca da parte aérea (M.F.P.A) (g), massa fresca da raiz (M.F.R.) (g), altura de planta (A.P.) (cm) e comprimento de raiz (C.R.) (cm) de plantas de tomate em função dos tratamentos com o filtrado de fungos sapróbios (20%) e inoculadas com *Alternaria solani*.

| Tratamentos | M.F.P.A. | M.F.R. | A.P | C.R. |
|---------------------------------|----------|--------|---------|---------|
| Controle (água) | 0.84 a* | 0.49 a | 106.5 b | 20.21 a |
| <i>Stachylidium bicolor</i> | 0.97 b | 0.41 a | 155.6 c | 20.58 a |
| <i>Periconia hispidula</i> | 0.73 a | 0.46 a | 59.5 a | 17.12 a |
| <i>Brachysporiella pulchra</i> | 0.80 a | 0.41 a | 76.1 a | 19.44 a |
| <i>Myrothecium leucotrichum</i> | 0.84 a | 0.48 a | 123.5 b | 20.0 a |
| <i>Pycnoporys sanguineus</i> | 0.80 a | 0.49 a | 75.0 a | 17.48 a |
| ASM | 0.81 a | 0.47 a | 64.1 a | 17.32 a |
| CV% | 11,73 | 16,89 | 28 | 13,76 |

*Médias seguidas de mesma letra, na coluna não diferem entre si pelo teste de teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). hpi=15dias

O filtrado do sapróbio *M. leucotrichum* também incrementou a altura de planta em 16%, no entanto não diferiu do controle água em relação às demais variáveis analisadas. Os filtrados de *P. hispidula*, *B. pulchra*, *P. sanguineus* e o BION reduziram os valores de massa fresca da parte área e da raiz, bem como os valores da altura de planta e comprimento da raiz.

Botrel (2013) afirma que mudas de café tratadas curativamente com filtrados de *Memnoniella echinata* e *Memnoniella levispora* (concentração de 3×10^4 ufc.mL⁻¹) aumentaram o peso seco de folhas (31-62%), em relação a testemunha. O mesmo autor verificou que o filtrado do sapróbio *P. macroporus*, na mesma concentração, contribuiu para o aumento das mudas de café na presença do patógeno em 40% quando comparadas a testemunha inoculada.

4.9. Efeito dos tratamentos a campo na qualidade pós-colheita de tomate cv. Cordillera

A Tabela 12 mostra que, quanto aos parâmetros de qualidade pós-colheita, as variáveis analisadas não diferiram da testemunha, indicando que não houve incremento significativo dos tratamentos utilizados a campo. No entanto, o tratamento calda bordalesa proporcionou o maior incremento na massa e volume dos frutos de tomate. Já o tratamento filtrado autoclavado de *S. bicolor*, reduziu a massa e o volume dos frutos em 18,3% e 9,4%. Frutos tratados com ASM, calda bordalesa e filtrado autoclavado de *S. bicolor* diminuíram o pH dos frutos, aumentando a acidez dos frutos.

Tabela 12. Análises físicas e químicas de frutos de tomateiro em pós-colheita, submetidos a diferentes tratamentos.

| Tratamentos | Massa (g) | pH | SST | ATT% | Vol. | Ratio |
|-------------------------------|-----------|--------|--------|--------|---------|---------|
| ASM | 234,96 a | 4,41 a | 3,12 a | 0,24 a | 272 a | 13,10 a |
| Calda bord. | 286,11 a | 4,42 a | 3,30 a | 0,25 a | 302,5 a | 13,11 a |
| Controle (água) | 255,89 a | 4,48 b | 3,65 a | 0,28 a | 270 a | 13,35 a |
| <i>Stachilidium bicolor</i> | 252,76 a | 4,48 b | 3,17 a | 0,21 a | 269,5 a | 15,15 a |
| <i>S. bicolor</i> autoclavado | 209,01 a | 4,39 a | 3,05 a | 0,26 a | 252 a | 12,09 a |
| CV% | 21,24 | 1,14 | 16,07 | 11,98 | 19,43 | 20,83 |

*Médias seguidas de mesma letra, na coluna não diferem entre si pelo teste de teste de Scott-Knott (p<0,05).

Em relação à acidez total titulável, todos os tratamentos apresentaram menores teores que o controle. O mesmo foi relatado por Pereira et al. (2010), onde avaliaram a eficiência de produtos alternativos na proteção da videira (*Vitis vinifera*) contra o míldio (*Plasmopara viticola*), bem como determinaram a influência desses produtos na qualidade dos frutos da cultivar Merlot e observaram que os tratamentos (produtos à base de extratos vegetais, manano-oligossacarídeos fosforilados, fosfitos e acibenzolar-S-metil - ASM, além de fungicidas tradicionais) resultaram em menor acidez titulável total que a da testemunha.

O teor de sólidos solúveis totais (°Brix) representa a porcentagem de sólidos dissolvidos no fruto ou no alimento. Pelos resultados obtidos, observa-se que este teor não foi influenciado pelos diferentes tratamentos. O maior teor de SST foi observado no controle água. Segundo Chitarra & Chitarra (2005), este parâmetro representa uma das melhores formas de avaliação do grau de doçura do produto e é maior com a evolução

da maturação, devido aos processos de biossíntese ou ainda da degradação de polissacarídeos.

Durante o processo de maturação normal dos frutos ocorre conversão dos ácidos orgânicos a açúcares solúveis, diminuindo a acidez (elevando os valores de pH) e a acidez titulável tende a diminuir com o avanço do amadurecimento dos frutos pela utilização dos ácidos orgânicos como substrato para a respiração (CHITARRA e CHITARRA, 2005).

5. CONCLUSÕES

O filtrado obtido de micélio de *Mirothecium leucotrichum* controlou a pinta preta causada pelo fungo *Alternaria solani*, por meio de atividade antimicrobiana *in vitro*, inibindo o crescimento micelial do patógeno, revelando grande potencial para o controle biológico.

O sapróbio *Stachilidium bicolor* teve sua eficácia revelada no controle da pinta preta em casa de vegetação, reduzindo cerca 96% da doença, bem como pela indução de enzimas de defesa como peroxidase, β -1,3- glucanase e lipoxigenase, além do efeito fitotônico apresentado.

O teor de clorofila foi alterado nas plantas de tomate tratadas com os filtrados de *Stachilidium bicolor* e *Mirothecium leucotrichum*, indicando sua eficiência para esse patossistema.

Os tratamentos calda bordalesa e filtrado não autoclavado de *Stachilidium bicolor* influenciaram os parâmetros de qualidade pós-colheita dos frutos de tomate.

6. REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, G. K., SHIGERU, T., HAN, O., IWAHASHI, H. E RAKWAL, R. Rice octadecanoid pathway. [Biochemical and Biophysical Research Communications](#), 317, 1-15, 2004.
- AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 5th ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. 922 p.
- ALMEIDA, H. O. Enzimas marcadoras de indução de resistência diferencialmente reguladas em soja resistente e suscetível à ferrugem-asiática-da-soja. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.47, n.2, p.163-172, fev. 2012.
- ALVARENGA, M. A. R. **Tomate: produção em campo, em casa de vegetação e em hidroponia**. Editora Lavras, UFLA, 2004.400 p.
- ANTEROLA, A.M.; LEWIS, N.G. Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity. **Phytochemistry**, v.61, p.221-294, 2002.
- ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *beta vulgaris*. **Plant Physiology**. V.24, p. 1-15, 1949.
- ASSI L. **Controle de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Scrib., na cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) pelo extrato do cogumelo *Pycnopus sanguineus* (L. ex. Fr.)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Unioeste. Marechal Cândido Rondon PR, 2005.
- ASSIS, R.L. **Agroecologia: visão histórica e perspectiva no Brasil**. In: AQUINO.A.M.; ASSIS, R.L. Agroecologia princípios e técnicas para uma agricultura orgânica sustentável. Brasília, D.F.: EMBRAPA, P.174-176, 2005.
- AULER, A.C.V.; CARVALHO, CARVALHO, D.D.C.; MELLO, S.C.M. DE, Antagonismo de *Trichoderma harzianum* a *Sclerotium rolfsii* nas culturas do feijoeiro e soja. **Revista Agro@mbiente On-line**, v. 7, n. 3, p. 359-365, setembro-dezembro, 2003. Artigo científico.
- AWAD, M. **Fisiologia pós-colheita de frutas**. Ed. Nobel. SP, 1993
- AXELROD, V.; CHEESBROUGH, T.M.; LAASKO, S. Lipoxigenase from soybeans. **Methods In Enzymology**, New York, v.71, p.441-451, 1981.
- BALDO, M. **Aspectos histológicos e bioquímicos da indução de resistência em feijoeiro e atividade antifúngica por derivados de *Pycnopus sanguineus***. 2008. 72 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2008.

BAYSAL, T.; DEMIRDOVEN, A. Lipoxygenase in fruits and vegetables: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p.491-496, 2007.

BELL, D. K.; WELLS, H. D.; MARKHAM, C. R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, v.72, n.4, p.379-382, 1982.

BELL, E., CREELMAN, R. A. E MULLET, J. E. A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy Science**, USA 92, 8675-8679, 1995.

BENINCA C.P. **Indução de fitoalexinas e atividade de peroxidases em sorgo e soja tratados com extratos de basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus***. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Unioeste. Marechal Cândido Rondon PR, 2007.

BOFF, P. **Epidemiologia e controle químico da mancha de estenfílio (*Stemphylium solani* Weber) e da pinta preta (*Alternaria solani*) em dois sistemas de condução do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill)**. 1988. 192p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1988.

BOMFIM, M.P.; SÃO JOSÉ, A.R.; REBOUÇAS, T.N.H.; ALMEIDA, S.S.; SOUZA, I.V.B.; DIAS, N.O. Avaliação antagônica *in vitro* e *in vivo* de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.1, p.61-67, 2010..

BONALDO, S. M.; PASCHOLATI, S. F.; ROMEIRO, R. S. **Indução de resistência: noções básicas e perspectivas**. In: CAVALCANTI, L. S.; PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. S. (Ed.). Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 11-28.

BOSTOCK, R.M. Signal conflicts and synergies in induced resistance to multiple attackers. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 55, p. 99-109, 1999.

BOTREL, D.A.; MEDEIROS, F.H.V.; REZENDE, L.C.; RESENDE, M.L.V. Fungos sapróbios podem controlar a mancha aureolada do cafeeiro? **Tropical Plant Pathology**. Manaus, v.38, p.487, ago. 2012, Suplemento.

BOTREL, D.A.; **Fungos sapróbios como agentes de biocontrole da mancha aureolada (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*) no cafeeiro**, 2013. 61p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2013

BRACKMANN, A. et al. Armazenamento de tomate cultivar “Cronus” em função do estágio de maturação e da temperatura. **Ciência Rural**, v. 37, n. 5, p. 1295-1300, 2007.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRAIOT, E., VIANELLO, A., PETRUSSA, E. E MACRI, F. Dissipation of eletrichemical proton gradient in phospholipase-induced degradation of plant mitochondria and microssomes. **Plant Sci.** 90, 31-39,1993.

BRANDÃO, D.F.R.; REZENDE, .D.C.; PASCHOLATI, S.F. **Utilização de fungos sapróbios do bioma-árido nordestino no controle de *Phytophthora nicotianae***. Disponível em:<https://www.uspdigital.usp.br>. Acesso em: 20 de novembro de 2013.

BRUCE, A.; DOUGLAS, S.; SUSAN, V.; RON, E.W. Effect of volatiles from bacteria and yeast on the growth and pigmentation of sapstain fungi. **Internacional Biodeterioration & Biodegradation**, v.51, p.101-108, 2003.

CALVO, N.S.; SUMIDA, C.H.; PEITL, D.C.; FLAVIA. M. E.; ARAUJO, F.A.; BALBI-PEÑA, M.I. Efeito de metabólitos não voláteis de fungos sapróbios no crescimento in vitro de *Xanthomonas vesicatoria*.**Tropical Plant Pathology**38 (Suplemento), agosto 2012 45º Congresso Brasileiro de Fitopatologia - Manaus, AM.

CAMPBELL, C.L. & MADDEN, L.V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York. J. Wiley & Sons. 1990.

CAMPOS, Â. D.; FERREIRA, A. G.; ANTUNES, I. F.; CASTRO, L. A. S. de . Indução de resistência sistêmica à antracnose em feijoeiro-comum pela raça delta avirulenta de *Colletotrichum lindemuthianum*.**Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.44, n.1, p. 15-21, 2009.

CARVALHO, C.R.L.; MONTOVANI, D.M.; CARVALHO, P.R.N.; MORAES, R.M. **Manual técnico de análise química de alimentos**. Campinas, 1990.

CARVALHO, J. L.; PAGLIUCA, L. G. Tomate: um mercado que não para de crescer globalmente. **Revista Hortifruti Brasil, Piracicaba**, v. 6, n. 58, p. 6-14, 2007.

CASTRO, M.E.A., ZAMBOLIM, L., CHAVES, G.M., CRUZ, C.D. & MATSUOKA, K. Variabilidade patogênica de *Alternaria solani*, agente causal da pinta-preta do tomateiro. **Summa Phytopathologica**v.8, p.24-28, 2000.

CASTRO, R.M. Bion® – a experiência brasileira. **Summa Phytopathologica**, v. 29, p. 117, 2003.

CAVALCANTI, L.S. e RESENDE, M.L.V. Efeito da época de aplicação e dosagem do acibenzolar-S-metil na indução de resistência à murcha-de-Verticillium em cacauero. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p. 67-71, 2004.

CAVALCANTI, F.R.; RESENDE, M.L.V.; ZACARONI, A.B.; RIBEIRO JUNIOR, P.M.; COSTA, J.C.B.; SOUZA, R.M. Acibenzolar-S-metil e Ecolife® na indução de respostas de defesa do tomateiro contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.31, p. 372-380, 2006.

CHAERANI, R.; VOORRIPS, R. E. Tomato early blight (*Alternaria solani*): the pathogen, genetics, and breeding for resistance. **Journal of General Plant Pathology**, Tokio, v. 72, p. 335–347, 2006.

CHAURASIA, R.; DANDEY, A.; PALNI, L. M. S.; TRIVEDIP, I.; KUMAR, B.; COLVIN, N. Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi *in vitro*. **Microbiological Research**, Amsterdam, v. 160, p. 75-81, 2005.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2.ed. rev. e ampl. Lavras: UFLA, 2005. 785p.

CREELMAN, R. A. E MULLET, J. E. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. **Annual Review Plant Physiology**, v.48, p.355-381, 1997.

CREISSEN, G. P.; EDWARDS, E. A.; MULLINEAUX, P. M. Glutathione reductase and ascorbate peroxidase. In: FOYER, C. H.; MULLINEAUX, P. M.(Eds.). **Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants**. CRC Press, Boca Raton, FL, 1994. p. 343–364.

COOK, R.J.; BAKKER, K.F. The nature practice of biological control of plant pathogens. St. Paul: **The American Phytopathological Society, 1983. 615p.**

COUTINHO, H. L. C. **Diversidade microbiana e agricultura sustentável** [online]. CNPS/EMBRAPA, 1996. Disponível em: <http://www.bdt.org.br>.

DANN, E.K., DIERS, B.W.; HAMMERSCHMIDT, R. The effect of pathogen inoculation or chemical treatment on activities of chitinase and -1,3 glucanase and accumulation of salicylic acid in leaves of green bean, *Phaseolus vulgaris* L. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 49, p. 307-319, 1996.

DAYSON F. R. BRANDÃO, DALILLA C. REZENDE, SÉRGIO F. PASCHOLATI. Utilização de fungos sapróbios do bioma semi-árido nordestino no controle de *Phytophthora nicotianae*. **Tropical Plant Pathology**. Manaus, v.38, p.487, ago. 2012, Suplemento.

DI PIERO, M.R.; PASCHOLATI, S. F. Indução de Resistência em plantas de pepino contra *Colletotrichum lagenarium* pela aplicação de extratos de basídocarpos de *Lentinula edodes* e de *Agaricus blazei*. **Summa Phytopathologica**, v.30, p. 243-250, 2004.

DI PIERO, R. M.; GARCIA JUNIOR, D.; TONUCCI, N. M. Indutores bióticos. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. S. (Eds.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba SP. FEALQ. pp. 29-50, 2005.

DUANGMAL, K.; APENTEN, R. K. O. A comparative estudy of poliphenoloxidasas from taro (*Colocasia esculenta*) e potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). **Food Chemistry**, Barking, v. 64, p. 351-359, 1999.

ELLIS, M. B. **Dematiaceous Hyphomycetes**. Kew, Commonwealth Mycological Institute, 1971. 608p.

EMBRAPA Hortaliças. **Cultivo de tomate para industrialização**. Importância econômica (2007). Disponível em www.cnph.embrapa.br/sistprod/tomate/index.htm
Acesso em: 06 de novembro de 2013.

FANCELLI, M.I. **Comparação patogênica, cultural, serológica e eletroforética entre isolados de *Alternaria solani* do tomate e da batata e variabilidade patogênica de *A. solani* f. sp. *lycopersici*** N. F. 1991. 80 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1991.

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

FERREIRA, S. M. R. et al. **Avaliação da qualidade do tomate**. In: SIMPÓSIO SUL-BRASILEIRO DE NUTRIÇÃO.; Florianópolis. Anais...Florianópolis:UFCS, 2000.p.437-441.

FERREIRA, S.M.R.; FREITAS, R.J.S.; LAZZARI, E.N. Padrão de identidade e qualidade do tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) de mesa. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.1, p.329-335, 2004.

FERREIRA, S. M. R.; QUADROS, D. A.; KARKLE, E. N. L.; LIMA, J. J.; TULLIO, L. T.; FREITAS, R. J. S. Qualidade pós-colheita do tomate de mesa convencional e orgânico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.30, n.4, p. 858-864, 2010.

FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.35, p.1039-1042, 2011.

FEUSSNER, I., KÜHN, H. E WASTERACK, C. (2001) The lipoxygenase dependet degradation of storage lipids. **Trends Plant. Sci.** 6, 268-273.

FIALHO, M. B.;TOFFANO, L.; PEDROSO, M. P.; AUGUSTO, F.; PASCHOLATI, S. F. Volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* inhibit the in vitro development of *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Amsterdam, v.26, n. 5, p. 925-932, 2010.

FIALHO, M.B. **Mecanismos de ação de compostos voláteis antimicrobianos produzidos por *Saccharomyces cerevisiae* sobre o desenvolvimento de**

Guignardia citricarpa, agente causal da pinta preta dos citros. Tese de Doutorado, Piracicaba, São Paulo, 2008.

FILGUEIRA, F.A.R. **Solanáceas II. Tomate: a hortaliça cosmopolitana.** In: FILGUEIRA, F.A.R. Novo Manual de Olericultura: Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 2. ed. Viçosa: UFV, 2003. p. 193-225, 2003.

FIORI-SUZUKI, C.C.L. SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; BONALDO, S.M.; TAKO, A.T.; TOLENTINO JUNIOR, J.B. Ativação da enzima glucanase em folhas de plantas de maracujazeiro tratadas com extratos dos cogumelos *Agaricus blazei* e *Lentinula edodes*. Congresso Paulista de Fitopatologia, 31, Campinas. **Summa Phytopathologica**, Botucati, v.34 (suplemento), p.104,2008.

FISCHER, A. M., DUBBS, W. E., BAKER, R. A., FULLER, M. A., STEPHENSON, L. C. E GRIMES, H. D. Protein dynamics, activity and cellular localization of soybean lipoxygenase indicate distinct functional role for individual isoforms. **Plant J.** 19, 543-554, 1999.

FLEURIET, A.J.J.; DELOIRE, A. Aspects histochimiques et biochimiques de la cicatrization des fruits de tomate blessés. **Phytopathologische Zeitschrift**, v.107, p.259-268, 1982.

FLURKEY, W.H. Polypeptide composition and amino-terminal sequence of broad bean polyphenoloxidase. **Plant Physiology**, Rockville, v. 91, p. 481-483, 1989.

FOOLAD, M. R.; MERK, H. L.; ASHRAFI, H. Genetics, genomics and breeding of late blight and early blight resistance in tomato. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, 27:75–107, 2008.

FRENCH, R.C. Volatile chemical germination stimulators of rust and other fungal spores. **Mycologia**, New York, v.84, p.277-288, 1992.

FRIES, N. Effects of volatile organic compounds on the growth and development of fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 60, p.1-21, 1973.

FRITIG B, HEITZ T, LEGRAND M. Antimicrobial proteins in induced plant defense. **Curr. Opin. Immunol.** 10:16-22, (1998).

FROEHLICH, J. E., ITHOH, A., E HOWE, G. A. Tomato allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase, two cytochrome P450s involved in oxylipin metabolism, are targeted to different membranes of chloroplast envelope. **Plant Physiology**, v.125, p.306-317, 2001.

GEHARDT, B., FISCHER, K., BALKENHOHL, T. J., POHENE, R.T, G., KÜHN, H., WASTERACK, C. Lipoxygenase-mediated metabolism of storage lipids in germinating sunflower cotyledons and β -oxidation of-13-hydroxy-octadeca-9, 11-dienoic acid by the cotyledonary glyoxysomes. **Planta**. v. 220, p. 919-930, 2005.

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 acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. **The Plant Cell**, vol. 8, p. 629-643, 1996.

GOTH, L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 196, n. 2-3, p. 143-151, 1991.

GRIFFITHS, A., BARRY, C., ALPUCHE-SOLIS, A. G. E GRIERSON, D. Ethylene and developmental signals regulate expression of lipoxygenase genes during tomato fruit ripening. **Journal of Experimental Botany**, v.50, p.793-798, 1999.

GUARDA, M.V. e DI PIERO, R.M. Atividade de glucanases e peroxidases em plantas de feijão tratadas com quitosana. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, p.184, 2007. Suplemento.

GUZZO, S.D.; CASTRO, R.M. DE; KIDA, K.; MARTINS, E.M.F. Ação protetora do acibenzolar-S-methyl em plantas de cafeeiro contra ferrugem. Arquivos do **Instituto Biológico**, São Paulo, v. 68, n. 1, p. 89-94, 2001.

HAMMERSCHMIDT, H. & DANN, E.K. Induced resistance to disease. In: RECHCIGL, N.A. & RECHCIGL, J.E. (Eds). **Environmentally Safe Approaches to Crop Disease Control**. Boca Raton, CRC – Lewis Publishers. 1997.

HAMMERSCHMIDT, R.; MÉTRAUX, J. P.; VAN LOON, L. C. Inducing Resistance: a summary of papers presented at the first international symposium on induced resistance to plant diseases, corfu. **European Journal Plant of Pathology**, Dordrecht, v. 107, p. 1-6, 2001.

HEIL, M. e BOSTOCK, R. M. Induced systemic (ISR) in the context of induced plant defences. **Annals of Botany**, Oxford, v. 89, p. 503-512, 2002.

HEITZ, T., BERGEY, D. R. E RYAN, C. A. A gene encoding a chloroplast - targeted lipoxygenase in tomato leaves is transiently induced by wounding, systemin and methyl jasmonate. **Plant Physiology**, v.114, p.1085-1093, 1997.

HIRAGA, S.; Ito, H., Sasaki, K., Yamakawa, H., Mitsuhara, I., Toshima, H., Matsui, H., Honma, M. and Ohashi, Y. A large family of class III plant peroxidases. **Plant and Cell Physiology**, Tokio, v. 42, n. 5, p. 462-468, 2001.

HOOKE, W. J. **Compendium of potato diseases**. St. Paul: APS, 123p, 1981.

IBGE. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/defaultt.ab.shtm>>. Acesso em: 20 de janeiro de 2014.

ISHIDA, A. K.N.; SOUZA, R. M.; RESENDE, M. L.V.; CAVALCANTI, F. R.; OLIVEIRA, D. L. POZZA, E. A. Rizobactéria e Acibenzolar-S-Metil (ASM) na indução de resistência à mancha angular e na expressão de respostas de defesa em algodoeiro. **Tropical Plant Pathology**; volume 33, número 1, páginas 27-34. Fevereiro 2008.

IURKIV, L.; ECKSTEIN, B.; BALBI-PEÑA, M.I.; STANGARLIN, J.R.; SCHWAN- ESTRADA, K.R.F. Atividade de peroxidase em tomateiro tratado com *Curcuma longa* e inoculado com *Alternaria solani*. **Summa Phytopathologica**, v.32, supl., p.22, 2006. Suplemento. Trabalho apresentado no CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA , 29., 2006, Botucatu.

JARDIM, B. C. **Análise da Indução de Lipoxigenase de Maracujá (*Passiflora edulis* SIMS) após o uso de Metil Jasmonato, Ferimento Mecânico e Herbivoria**. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF- Campos dos Goytacazes – RJ. Tese doutorado, 2009.

JONES, J.P. Early blight. In: Jones, J.B., Jones, J.P. & Stall, R.E. (Eds.). **Compendium of Tomato Diseases**. St. Paul. APS Press. 1991. pp.13-14.

KADER, A.A.; MORRIS, L.L.; STEVENS, M. A.; ALBRIGHT-HOLTON, M. Composition and flavor quality of fresh market tomatoes a influenced by some postharvest handling procedures. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v.113, n.5, p.742-745, 1978.

KANAZAWA, Y.; SHICHI, H.; URITANI, I. Biosynthesis of peroxidases in sliced or black rot-infected sweet potato roots. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.29, p.840-847, 1965.

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

KEMP, G. et al. Disease developmente and β -1,3-glucanase expression following leaf rust infection in resistant and susceptible near-isogenic wheat seedlings. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 55, p.45-52, 1999.

KINI, K. R.; VASANTHI, N. S.; SHETTY, H. S. Induction of β -1,3-glucanase in seedlings of pearl millet in response to infection by *Sclerospora graminicola*, **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 106, p. 267-274, 2000.

KOLOMIETS, M. V., HANNAPEL, D. J., CHEN, H., TYMENSON, M. E GLADON, R. J. (2001) Lipoxygenase is involved in the control of potato tuber development. *Plant Cell* 13, 613-623.

KROSS, R.K.; CAVALCANTI MARTA, M.E.R.M.; BRAGA, E.M. **Influência da epiderme do tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) na transferência de massa durante o tratamento osmótico**. Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos (SLACA), 4. Campinas, Anais... Campinas: UNICAMP, 2001.

KUHN, O.J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de produção.** 2007.140p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A. **Doenças do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.).** In: KIMATI, H., AMORIN, L., BERGAMIN FILHO, A., CAMARGO, L. E. A., REZENDE, J. A. M. (Eds.). Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. São Paulo: Editora Ceres, v. 2, p. 607-626, 2005.

KUZNIAK, E; SKLODOWSKA, M. Fungal pathogen-induced changes in the antioxidante systems of leaf peroxisomes from infected tomato plants. **Planta**, New York, v.222, p.192-200, 2005.

LABANCA, E.R.G. **Purificação parcial de elicitores presentes em: atividade como *Saccharomyces cerevisiae* indutores de resistência em pepino (*Cucumis sativus*) contra *Colletotrichum lagenarium* e da síntese de gliceolina em soja** 2002. 118p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

LANA, M. M.; MOITA, A. W.; SOUZA, G. S.; NASCIMENTO, E. F. DO; MELO, M. F. de. **Identificação das Causas de Perdas Pós-colheita de Tomate no Varejo em Brasília-DF.** Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. Embrapa Hortaliças, Brasília, 2006. 25p.

LAPUERTA, J.C.. **Anatomia y fisiologia de la planta.** In: NUEZ, F. El cultivo do tomate. Barcelona. Mundi-Prensa, p.43-91, 1995.

LEVER, M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 47, p. 273-279, 1972.

LIMA, L.H.C.; MARCO J.L. de; FELIX, C.R. **Enzimas hidrolíticas envolvidas no controle biológico por micoparasitismo.** IN: MELO, IS.; AZEVEDO, J.L. (Ed.) Controle biológico. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2000, v.2, cap.8, p.263-304.

LOPES. C.A. **Doenças: identificação e controle.** In: SILVA, JB.; GIORDANO, LB. (Org.). Tomate para processamento industrial. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia. Embrapa Hortaliças, p. 88-111. 2000.

LUENGO, R. F. A.; MOITA, A. W.; NASCIMENTO, E. F.; MELO, M. F. Redução de perdas pós-colheita em tomate de mesa acondicionado em três tipos de caixas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.19, n.2, p.151-154, 2001.

LUSSO, M. F. G.; PASCHOLATI, S. F. Activity and isoenzymatic pattern of soluble peroxidases in maize tissues after mechanical injury or fungal inoculation. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 25, p. 244-249, 1999.

MACK, A. J.; PETERMAN, T.K.; SIEDOW, J.N. **Current Topics in Biological and Medical Research**, v.13, p.127-154, 1987.

MAKISHIMA N. E MELO, W. .M., Embrapa Hortaliças – **O REI DAS HORTALIÇAS** http://www.grupocultivar.com.br/arquivos/hf29_rei.pdf

MALAMY, J., CARR, J. P., KLESSIG, D. F. & RASKIN, I. Salicylic acid a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. **Science**, 250: 1002-1004, 1990.

MARBA, L. D.; BENATO, E. A. ET AL., Bioprospecção de fungos sapróbios do semi-árido nordestino para controle de *colletotrichum* sp. em uva pós-colheita. **Tropical Plant Pathology**38 (Suplemento), agosto 2012.

MARGIS-PINHEIRO, M.; SANDRONI, M.; LUMMERZEIM, M.; OLIVEIRA, D. A defesa das plantas contra as doenças. **Ciência Hoje**, v. 25, p. 24-31, 1999.

MEINEREZ, C.C.; BALDO, M.; FRANZENER, G.; YURKIV, L. BRAGA, C.L.; KUHN, O.; STANGARLIN, J. R. Potencial indutor de resistência em soja do extrato aquoso de *P. sanguineus*. Congresso Brasileiro de Fitopatologia. 40. Maringá. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v. 32 (suplemento), p.304; 2007.

MELAN, M. A., DONG, X., ENDARA, M. E., DVIS, K. R., AUSUBEL F. M. E PETERMAN, T. K. An *Arabidopsis thaliana* lipoxygenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid, and methyl jasmonate. **Plant Physiol.** 99, 220-228, 1993.

MELLO, F. E. et al. Inibição de *Xanthomonas vesicatoria* por compostos voláteis produzidos por fungos sapróbios. **Tropical Plant Pathology**. Manaus, v.38, p.487, ago. 2012, Suplemento.

MERCIER, J., SMILANICK, J.L. Control of green mold and sour rot of stored lemons by biofumigation with muscodor albus. **Journal of Biological Control**, 2005.

MERCIER, J.; JIMÉNEZ, J. I. Control of fungal decay of apples and peaches by the biofumigant fungus *Muscolor albus*. **Postharvest biology and Technology**, Amsterdam, v. 31, p. 1-8, 2004.

MINAMI, K., HAAG, H., P. **O tomateiro**. Campinas: Fund. Cargill, 1989. 397p.

MOHAMMADI M, KAZEMI H. Changes in peroxidase and polyphenol activity in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. **Plant Science**.2002;162:491–498.

MONTEIRO, C. S.; BALBI, M. E.; MIGUEL, O. G.; PENTEADO, P. T. P. da S.; HARACEMIV, S. M. C. Qualidade nutricional e antioxidante do tomate “tipo italiano”. **Alimentos e Nutrição, Araraquara**, v.19, n.1, p.25-31, 2008.

MORAES, M. G. Mecanismos da resistência sistêmica adquirida em plantas. **Revisão Anual de Patologia Vegetal**, v.6, p. 261-284, 1998.

MORETTI, C. L. **Protocolos de Avaliação da Qualidade Química e Física de Tomate**. Comunicado técnico, Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2006, 9p.

MORGAN, L. **Tomato fruit flavor and quality evaluation**. Part I. Disponível em: <www.fertcut.com/search.cmf> Acesso em: 6 Jan. 2014.

NARUSAKA, Y.; NARUSAKA, M.; HORIO, T.; ISHII, H. Comparison of local and systemic induction of acquired disease resistance in cucumber plants treated with benzothiadiazoles or salicylic acid. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 40, n. 4, p. 388-395, 1999.

NICHOLSON, R.L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Phytopathology** 30:369–389. 1992.

NOBLES, M.K.; FREW, B. P. Studies in wood-inhabiting hymenomycetes. The genus *Pycnoporus* Karst. **Canadian Journal of Botany**, v.40, p.987-1016, 1962.

PASCHOLATI, S.F. **Potencial de *Saccharomyces cerevisiae* e outros agentes bióticos na proteção de plantas contra patógenos**. Piracicaba, 1998. 123p. Tese (Livre Docência)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. USP

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. **Hospedeiro: Mecanismo de resistência**. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, cap. 22, p. 417-454.

PAZUCH, D. **Potencial indutor de fitoalexinas do filtrado de cultura e extrato de basiocarpo e de micélio de *P. sanguineus* em sorgo e soja**. 2007, 37 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Agronomia), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2007.

PENG, X. et al. Induced resistance to *Cladosporium cucumerinum* in cucumber by pectinases extracted from *Penicillium oxalicum*. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, Israel, v. 32, p. 377-387, 2004.

PERALTA, I. E.; KNAPP, S.; SPOONER, D. M. New species of wild tomatoes (*Solanum* section *Lycopersicon*: Solanaceae) from Northern Peru. **Systematic Botany**, Laramie, v. 30, p. 424-434, 2005.

PERALTA, I. E.; SPOONER, D. M. Granule-bound starch synthase (GBSSI) gene phylogeny of wild tomatoes (*Solanum* section *Lycopersicum* [Mill] Wettst. Subsection *Lycopersicum*). **American Journal of Botany**, New York, v.88, n. 10, p.1888-1902, Oct. 2001.

PEREIRA, R.B., RESENDE, M.L.V., RIBEIRO JUNIOR, P.M., AMARAL, D.R., CIAVARELI, G.C.L., CAVALCANTI, F.R. Ativação de defesa em cacaueteiro contra a murcha-de-verticílio por extratos naturais e acibenzolar-S-metil. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.43, n.2, p.171-178, fev. 2008.

PEREIRA, V. F. , RESENDE, M.L.V, MONTEIRO , A.C. A., RIBEIRO JÚNIOR, P.M., REGINA, M.A., MEDEIROS, F. C. L. Produtos alternativos na proteção da videira contra o míldio **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.45, n.1, p.25-31, jan. 2010.

PETER, M. G. **Chemical Modifications of Biopolymers by Quinones and Quinone Methides**. *Angewandte Chemie International Edition in English*, Weinheim, v. 28, p. 555-570, 1989.

PICCININ, E. **Uso de *Saccharomyces cerevisiae* na proteção de plantas de sorgo (*Sorghum bicolor*), maracujá azedo amarelo (*Passiflora edulis*) e eucalipto (*Eucalyptus* spp.) contra fitopatógenos fúngicos e bacterianos**. 1995.107p. Dissertação (Mestrado)-Escola Superior de Agricultura. “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1995.

PINHEIRO, R. V. R.; MARTELETO, L. O.; SOUZA, A. C. G.; CASALI, W. D.; CONDÉ, A. R. Produtividade e qualidade dos frutos de dez variedades de goiaba, em Visconde do Rio Branco, Minas Gerais, visando ao consumo ao natural e a industrialização. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 31, p. 360-387, 1984.

PORTA, H. E ROCHA-SOSA, M. Plant lipoxygenase. Physical and molecular features. **Plant Physiol.** v.130, p.15-21, 2002.

PORTA, H., FIGUEIROA-BALDERAS, R. E. E ROCHA-SOSA, M.. Wounding and pathogen infection induce a chloroplast-targeted lipoxygenase in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Planta Physiology**, v.227, p.363-373, 2008.

PORTA, H., RUEDA-BENÍTEZ, P., CAMPOS, F., COLMENERO-FLORES, J. M., COLORADO, J. M., CARMONA, M. J., COVARRUBIAS, A. A. E ROCHA-SOSA, M. Analysis of lipoxygenase mRNA accumulation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during development and stress conditions. **Plant Cell Physiology**, v.40, p.850-858, 1999.

PUNJA, Z.K.; UTKHEDE, R.S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. **Trends in Biotechnology**, v.21, p.400-407, 2003.

RAMAMOORTHY, V.; RAGUCHANDER, T.; SAMIYAPPAN, R. Enhancing resistance of tomato and hot pepper to *Pythium* diseases by seed treatment with fluorescent pseudomonads. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 108, p. 429- 441, 2002.

RANCÉ, I., FOURNIER, J. E. E ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M. T. The incompatible interaction between *Phytophthora parasitica* var *nicotianae* race and tobacco is suppressed in transgenic plants expressing antisense lipoxygenase sequences. **Proceedings Nacional Academy Science**. USA. v.95, p.6554-6559, 1998.

RANGEL, M., MACHADO, L. T. O., CUNHA, M. E JACINTO, T. Accumulation of chloroplast-targeted lipoxygenase in passion fruit in response to methyl jasmonate. **Phytochemistry**. v.60, p.619-625, 2002.

RASMUSSEN, J. B. et al. cDNA cloning and systemic expression of acidic peroxidases associated with systemic acquired resistance to disease in cucumber. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 46, p. 389-400, 1995.

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

RESENDE JTV; CARDOSO MG; MALUF WR; SANTOS CD; GONÇALVES LD; RESENDE LV; NAVES FO. 2002. Método colorimétrico para quantificação de açúcares em genótipos de tomateiro. **Ciência e Agrotecnologia** 26: 1204-1208

RICHARD-FORGET, F. C.; GAUILLARD, F. A. Oxidation of chlorogenic acid, catechins, and 4-methylcatechol in model solutions by combinations of pear (*Pyrus communis* cv. *Williams*) polyphenol oxidase and peroxidase: a possible involvement of peroxidase in enzymatic browning. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 45, p. 2472-2476. 1997.

RIVERA, M. E. et al. Differential expression of β -1,3-glucanase susceptible and resistant melon cultivars in response to infection by *Sphaerotheca fusca*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 61, p. 257-265, 2002.

RODRIGUES, E. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de gengibre e eucalipto *in vitro* e em fibras de bananeira infectadas com *Helminthosporium* sp. **Acta Scientiarum: Agronomy**, Maringá, v. 28, n. 1, p. 123-127, 2006.

ROMEIRO, R. S. Indução de Resistência em plantas a patógenos. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dfp/bac/indures.pdf>> Acesso em 27 de maio de 2014.

ROTEM, J. **The genus Alternaria: biology, epidemiology and pathogenicity**. St Paul, Minnesota, USA: APS Press, 1994.

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

SANTOS NETO, J. **Bioatividade de subprodutos de capim-limão e proteção do tomateiro, em sistema de cultivo orgânico, contra septoriose**, 2012. 139 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR., 2012.

SCANDALIOS, J. G. Regulation and properties of plant catalases. In: FOYER C. H.; MULLINEAUX, P. M. (Eds.). **Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants**. CRC Press, Boca Raton, FL, 1994. p. 275-315.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S. Uso de plantas medicinais no controle de doenças de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 8, p. 54-56, 2003.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R. **Extratos de óleos essenciais de plantas medicinais na indução de resistência.** In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M. L.V.; ROMEIRO, R. S. (Eds.) Indução de resistência em plantas patógenos e insetos. Piracicaba. FEALQ. p. 125-138, 2005.

SELITRENNIKOFF, C. P. Antifungal Proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 2883–2894, 2001.

SIEDOW, J. N. Plant lipoxygenase: structure and function. **Annual review of Plant Physiology**, v.42, p.145-188, 1991.

SILVA, H.S.A. et al. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. **Biological Control**, Orlando, v. 29, p. 288-295, 2004.

SILVA, J.B.C.; GIORDANO, I.B. **Produção mundial e nacional. Tomate para processamento industrial.** Brasília: EMBRAPA Hortaliças, 2000.

SILVA, M.D. **Avaliação bioquímica da Via das Lipoxigenases em plantas de soja infectadas com cancro da haste.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1999. 43p. Tese de Mestrado.

SILVA, M.D., OLIVEIRA, M.G.A, LANNA, C.,PIRES, C.V., PIOVES,N.D, JOSÉ, I.C.BATISTA,R. B., BARROS, E.G.,MOREIRA, M.A.Caracterização da via das lipoxigenases em plantas de soja resistentes e susceptíveis a *Diaphorte phaseolorum* f.sp. *meridionalis*, agente causal do cancro-da-haste. **Revista Brasileira Fisiologia Vegetal.**, v.13,p.316-328, 2001.

SILVA, R.F. **Indução de resistência em plantas de berinjela e tomate por *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra bactérias causadoras de murcha (*Ralstonia solanacearum*) e cancro (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*).** 2007, 109 f. Tese (Doutorado na área de Fitopatologia), Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

SILVA, R.F., PASCHOLATI, S.F. & BEDENDO, I.P. Indução de resistência em tomateiro por extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*. **Fitopatologia Brasileira**,v.32, p.189-196, 2007.

SILVA, S.R. da; PASCHOLATI, S.F. *Saccharomyces cerevisiae* protects maize plants, under greenhouse conditions, against *Colletotrichum graminicola*. **Journal of Plant Disease and Protection**, v.99, n.2, p.159-167, 1992.

SILVA, R. A.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; OLIVARES, F. L. 2008. Defesa de plantas contra o ataque de fitopatógenos. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. 49 p. (Documentos/Embrapa Agrobiologia, ISSN 1517-8498; 250).

SMÂNIA, A.; MONACHE, F.D.; SMANIA, E.F.; GIL, M.L; BENCHETRIT L.C.; CRUZ F.S., Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus*. **Journal of Ethnopharmacology** 45:177-181, 1995.

SOARES, A. M. S.; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadinha, MA, v. 1, n. 1, p. 9, 2007.

SOARES, R. M.; MARINGONI, A. C.; LIMA, G. P. P. Ineficiência de acibenzolar-S-methyl na indução de resistência de feijoeiro à murcha de *Curtobacterium*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 373-377, 2004.

STANGARLIN, J.R., SCHWAN-ESTRADA, K.R.F., CRUZ, M.E.S. & NOZAKI, M.H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.11, p.16-21, 1999.

STICHER, L, MAUCH-MANI, B, METRAUX, J.P. Systemic Acquired Resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v.35, p.235-270, 1997.

STINTIZI, A.; HEITZ, T.; PRASAD, V.; WIEDEMANN-MERDINOGLUS, S.; KAUFFMANN, S.; GEOFFROY, P.; LEGRAND, M.; FRITIG, B. Plant pathogenesis-related proteins and their role in defense against pathogens. **Biochimie**, v.75, p.687-706, 1993.

STOTZKY, G.; SCHENCK, S.; PAPAVIDAS, G.C. Volatile organic compounds and microorganisms. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Ration, v.4, p.333-382, 1976.

THORDAL-CHRISTENSEN, H. et al. cDNA cloning and characterization of two barley peroxidase transcripts induced differentially by the powdery mildew fungus *Erysiphe graminis*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 40, p. 395-409, 1992.

TONUCCI, N.M., **Efeito de extratos aquosos do basidiocarpo e micélio de *Lentinula edodes* (Shiitake) sobre *Colletotrichum sublineolum*, *Alternaria solani*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* e *Tobacco masaic vírus* (TMV)**. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Esalq- Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, SP., 2004.

TÖFOLI, J.G.; DOMINGUES, R.J. **Alternarioses em hortaliças: sintomas, etiologia e manejo integrado**. Instituto Biológico, São Paulo, v.66, n.1/2, p.23-33, jan./dez., 2004.

TÖFOLI, J.G.; DOMINGUES, R.J. **Alternarioses em hortaliças: sintomas, etiologia e manejo integrado**. 2006. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2006_3/alternarioses/Index.htm>. Acesso em: 27/5/2014.

TOILLIER, S.L., IURKIV, L., MEINERZ C.C, BALDO, M. VIECELLI, C.A. TOMANKOVA, K. Biochemical aspects of reactive oxygen species formation in the interaction between *Lycopersicon* spp. and *Oidiumneolycopersici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 68, p. 22–32, 2006.

TOMÁNKOVÁ, K.; LUHOVÁ, L.; PETØIVALSKÝ, M.; PEÈ P.; LEBEDA A. Biochemical aspects of reactive oxygen species formation in the interaction between *Lycopersicon* spp. and *Oidium neolyopersici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 68, p. 22–32, 2006.

VALE, F.X.R., ZAMBOLIM, L., PAUL, P.A. & COSTA, H. **Doenças causadas por fungos em tomate**. In: Zambolim, L., Vale, F.X.R. & Costa, H. (Eds.) Controle de Doenças de Plantas: Hortaliças. Viçosa MG. Universidade Federal de Viçosa. 2000. pp. 699-756.

VAN BREUSEGEM, F., VRANOVA, E., DAT, J.F., AND INZE, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, v.131, p.405–414, 2001.

VAN LOON, L. C. et al. Recommendations for naming plant pathogenesisrelated proteins. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v. 12, p. 245-264, 1994.

VAN LOON, L. C. Induced resistance in plants and the role of pathogenesisrelated proteins. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 103, p.753-765, 1997.

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

VERA-ESTRELLA, R.; BLUMWALD, E.; HIGGINS, V. J. Non-specific glycopeptide elicitors of *Cladosporium fulvum*: evidence for involvement of active oxygen species in elicitor-induced effects on tomato cell suspensions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 42, p. 9-22, 1993.

VIDHYASEKARAN, P. **Fungal pathogenesis in plants and crops: molecular biology and host defense mechanisms**. 2nd ed. Boca Raton, CRC Press. 2008. 509 p.

VIECELLI, C.A. **Controle da mancha angular e análise bioquímica de resistência em feijoeiro tratado com extratos de *Pycnopus sanguineus***. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2008.

VIECELLI, C. A.; STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Indução de resistência em feijoeiro a mancha angular por extratos de micélio de *Pycnopus sanguineus*. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.1, p.73-80, 2010.

VIEIRA, A.A. Biochemical evaluation of lipoxygenase pathway of soybean plants submitted to wounding. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 13:5-12, 2001.

WHEARTLEY, R. E. The consequences de volatile organic compound mediated bacterial and fungal interaction. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Dodrecht, v. 81, p. 357-364, 2002.

WHITAKER, J.R. Polyphenol oxidase. In: FENNEMA, O.R. (Ed.) **Principles of Enzymology for the Food Sciences**. New York: Marcel Dekker. Inc. 1994. p. 543-556.

WULFF, N.A.; PASCHOLATI, S.F. Preparações de *Saccharomyces cerevisiae* elicitoras de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo. **Scientia Agricola**, v.55, n.1, p. 138- 143, 1998.

