

QUITOSANA NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA AO TOMBAMENTO DE PLÂNTULAS DE TOMATE CAUSADO POR *Rhizoctonia solani* Kuhn

Rita de Cassia Dosciatti Serrão Rocha¹; Sérgio Miguel Mazaro²; Jean Carlo Possenti³; Álvaro Rodrigo Freddo^{4*}; Ivan Carlos Zorzi⁵; Nean Locatelli Dalacosta⁵

SAP 15038 Data envio: 01/09/2016 Data do aceite: 19/12/2016
Sci. Agrar. Parana., Marechal Cândido Rondon, v. 16, n. 4, out./dez., p. 430-435, 2017

RESUMO - O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial da quitosana na indução de resistência ao tombamento de plântulas em tomateiro causado por *Rhizoctonia solani*. As sementes de tomateiro foram submersas em solução com quitosana por 20 minutos, nas concentrações de 0,25%; 0,5%; 1% e 2% e na testemunha (somente água destilada). As sementes foram semeadas em bandejas de isopor contendo substrato inoculado com *R. solani* e mantidas em câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 25 ± 2 °C por 14 dias. Após este período foi avaliada a sobrevivência de plântulas, comprimento e massa da matéria fresca e atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase (FAL), quitinase e β -1,3-glucanase. Os resultados obtidos demonstraram que a quitosana quando aplicada em tratamento de sementes de tomate, na concentração de 0,30%, favorecem a sobrevivência das plântulas em substrato inoculado com o patógeno. Este resultado está relacionado principalmente a ativação de mecanismos de resistência no vegetal, evidenciados pela ativação das enzimas FAL, quitinases e β -1,3-glucanases.

Palavras-chave: fitopatologia, proteínas relacionadas à patogênese (PRP's), *Solanum lycopersicum* L.

CHITOSAN IN THE INDUCTION OF RESISTANCE TO THE DAMPING OFF TOMATO SEEDLINGS CAUSED BY *Rhizoctonia solani* Kuhn

ABSTRACT - The objective of this study was to evaluate the potential of chitosan in inducing resistance against damping off in tomato caused by *Rhizoctonia solani*. The tomato seeds were submerged in solution with chitosan for 20 minutes in concentrations of 0.25%; 0.5%; 1% and 2% and in the control (distilled water only). The seeds were sown in polystyrene trays containing substrate inoculated with *R. solani* and kept in a growth chamber with 12 hours photoperiod and temperature of 25 ± 2 °C for 14 days. After this period we evaluated the survival of seedlings, length and fresh weight and activity of the enzyme phenylalanine ammonia lyase (PAL), chitinase and β -1.3-glucanase. The results showed that chitosan when applied on tomato seeds at concentration of 0.30% increased the survival of seedlings growing in substrate inoculated with the pathogen. This result is mainly related to the activation of resistance mechanisms in the plant, evidenced by activation of PAL, chitinases and β -1.3-glucanases enzymes.

Key words: plant pathology, pathogenesis-related proteins (PRP's), *Solanum lycopersicum* L.

INTRODUÇÃO

O tomateiro é uma espécie olerícola amplamente difundida em todos os estados brasileiros, sendo a segunda mais cultivada em área no país, superada somente pela batata-inglesa (*Solanum tuberosum*). A produção brasileira de tomate está concentrada nas regiões Sudeste (37,74%) e Centro-oeste (33,8%). No Brasil, na safra 2011, os estados com maior produção foram: Goiás (32,56%), São Paulo (19,53%), Minas Gerais (10,16%), Paraná (7,85%) e Bahia (7,67%) (IBGE, 2012).

Anualmente várias toneladas de tomate são deixadas de produzir devido a danos causados por

doenças, sendo que nos estádios iniciais da cultura, o tombamento de plântulas é uma doença que dificulta o processo de produção de mudas e a estabilização da cultura no início do seu desenvolvimento (NUEZ, 2001). O tombamento ou “damping-off” é considerado um dos maiores problemas das doenças de plantas, porém, o seu controle ou prevenção é dificultado pelo envolvimento de muitos patógenos que atuam isoladamente ou combinados (STEPHENS et al., 1981).

A doença caracteriza-se por atacar a cultura na fase de plântula, podendo ocorrer na pré e pós-emergência. A sintomatologia é caracterizada pela presença de lesões

¹Engenheira Agrônoma, Doutoranda, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, UTFPR, campus Pato Branco, Paraná, Brasil. E-mail: ritadserrao@hotmail.com

²Engenheiro Agrônomo, Dr., Professor da UTFPR, campus Dois Vizinhos, Paraná, Brasil. E-mail: sergio@utfpr.edu.br

³Engenheiro Agrônomo, Dr., Professor da UTFPR, campus Dois Vizinhos. E-mail: jpossenti@utfpr.edu.br

⁴Engenheiro Florestal, Dr., Professor, União de Ensino do Sudoeste do Paraná, UNISEP, Av. Presidente Kennedy 2601, CEP 85660-000, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil. E-mail: alvaro.freddo@hotmail.com. *Autor para correspondência

⁵Acadêmicos de Agronomia, UTFPR, campus Dois Vizinhos. E-mail: ivanzorzi@gmail.com; nean.locatelli@hotmail.com

deprimidas nos tecidos vegetais jovens que provocam o tombamento da muda, podendo ocorrer antes da emergência da planta, caracterizando uma redução no estande de semeadura, nesse caso diz-se que ocorreu “damping off” de pré-emergência (KUHN, 2007).

Dentre os fungos que causam tombamento de plântulas, *Rhizoctonia solani* está entre as espécies mais relevantes deste tipo de doença (BEDENDO, 2011).

Dentre os métodos de controle alternativo, cada vez mais tem se destacado o uso de indutores de resistência das plantas para controle de doenças de plantas. A indução de resistência é a ativação de um estado de resistência contra doenças, sendo este induzido sistemicamente em plantas pela utilização de agentes externos bióticos ou abióticos, sem nenhuma alteração do genoma da planta, sendo estes chamados de elicitores (STADNIK, 2000; HAMMERSCHIMIDT et al., 2001).

Entre os indutores de resistência que vêm sendo avaliados na agricultura pode-se citar a quitosana, a qual vem demonstrando potencial pela sua atividade elicitora sobre uma grande variedade de fitopatógenos (EL GHAOUTH et al., 1992; EL GHAOUTH et al., 1997; BHASKARA REDDY et al., 2000; DEVLIEGHIERE et al., 2004; PEREIRA et al., 2008). Em tratamentos de sementes de tomate e beterraba com quitosana, Mazaro et al. (2009) observaram potencial dos tratamentos na redução da incidência de tombamento na concentração de 2,5%.

Já em tratamentos de sementes de acácia-negra (*Acacia mearnsii*), trabalho realizado por Freddo et al. (2012), as concentrações de quitosana entre 0,6% e 0,9% são recomendadas para reduzir o tombamento e acelerar o desenvolvimento inicial das plântulas. Ainda, estes autores observaram que a quitosana demonstra capacidade de alteração do teor de proteínas dos tecidos vegetais das plântulas e da capacidade de ativação da enzima FAL. Em estudo realizados por Freddo et al. (2014), com quitosana sobre *R. solani* em condições *in vitro*, demonstram ação fungistática e sugeriram estudos futuros, no sentido de se averiguar a eficácia da aplicação de quitosana no controle de *R. solani* em campo.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial da quitosana no tratamento de sementes, para indução de resistência em plântulas de tomate (*S. lycopersicum*) ao tombamento causado por *R. solani*.

MATERIAL E MÉTODOS

O isolado de *R. solani* foi obtido de plântulas de tomate infectadas com o mesmo. O micélio do fungo foi isolado e cultivado primeiramente em placas de Petri® com meio BDA (batata, dextrose, ágar), incubadas em câmara de crescimento à temperatura de 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 12 h. Em seguida, o micélio do fungo foi inoculado em sementes de trigo autoclavadas, que foram incubadas à temperatura de 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 12 h, até sua completa colonização.

Em seguida, procedeu-se a esterilização do substrato para cultivo do tomate. O substrato da marca Plantmax Florestal® foi esterilizado em autoclave a 120 °C por 40 min. Após a esterilização do substrato, procedeu-se

a inoculação do mesmo com o patógeno cultivado nas sementes de trigo, na proporção de 10 g Kg⁻¹, três dias antes de receber a semeadura.

As sementes de tomate utilizadas no experimento foram da variedade Santa Cruz, tipo salada, da empresa Isla Sementes, sem tratamento químico, as quais foram imersas em soluções de quitosana. Estas soluções foram preparadas com quitosana oriunda de farmácia de manipulação, com 98% de pureza do produto, a qual foi diluída em solução contendo ácido acético a 1% e então, ajustadas às concentrações com água destilada (0,25%; 0,5%; 1% e 2%). O tratamento das sementes por imersão foi realizado por período de 20 min, sendo que para a testemunha utilizou-se somente água destilada.

Em seguida, as sementes foram semeadas em bandejas de poliestireno expandido, contendo o substrato inoculado com sementes de trigo miceliadas com *R. solani*. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente ao acaso, com cinco repetições para cada tratamento, sendo considerada como repetição uma bandeja contendo vinte células, aonde cada célula recebeu uma semente tratada ou não, de acordo com as concentrações descritas acima.

As bandejas foram incubadas por 14 dias em câmara de cultivo, com controle de temperatura (25 ± 2 °C), luminosidade (fotoperíodo de 12 h) e umidade ($70 \pm 10\%$). Foram analisadas as seguintes variáveis ao término do experimento: sobrevivência e comprimento de plântulas, massa da matéria fresca e análises bioquímicas. Os testes bioquímicos foram avaliados nos tratamentos testemunha e na concentração de quitosana de 0,25%, onde se procedeu a avaliação dos teores das enzimas fenilalanina amônia-liase (FAL), β -1,3-glucanases e quitinases. Para estas análises, foram constituídas amostras de 0,5 g, mescladas entre todas as partes do vegetal (folhas, caulículo e raízes), as quais foram imediatamente após a coleta, congeladas e armazenadas em refrigeração (-20 °C) até as avaliações.

A determinação da atividade da FAL foi realizada por quantificação colorimétrica do ácido trans-cinâmico liberado do substrato fenilalanina, conforme metodologia descrita por Kuhn (2007). Para a quantificação das atividades de quitinases e β -1,3-glucanases, seguiram-se os procedimentos descritos por Guzzo e Martins (1996), com adequações, sendo que as amostras foram maceradas em 2,0 mL de tampão acetato 100 mM (pH 5,0), com posterior centrifugação (20.000 giros por 25 min, a -4 °C). O sobrenadante foi coletado e utilizado para a avaliação da atividade das enzimas. A atividade enzimática da quitinase foi avaliada através da liberação de fragmentos solúveis de “chitin-azure”, a partir de quitina carboximetilada marcada com remazol brilhante violeta (Sigma Aldrich®). Para determinação espectrofotométrica das atividades de β -1,3-glucanases, nos extratos foi utilizado como substrato curdlan-remazol azul brilhante (Sigma Aldrich®; 4 mg mL⁻¹).

Os dados foram submetidos ao teste de Normalidade de Liliefors para verificar o atendimento aos pressupostos do modelo matemático. Os dados que atenderam aos pressupostos, foram submetidos à análise de

variância ($p \leq 0,05$) e quando significativos, foram submetidos à análise de regressão, com um nível de 5% de significância. Já os dados que não seguiram a distribuição de frequências normal, foram avaliados pelo desvio padrão das suas médias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A sobrevivência de plântulas de tomate em substrato inoculado com *R. solani*, foi favorecido pelo tratamento das sementes com quitosana, até a concentração de 0,60%, quando comparado com a testemunha. Acima desse valor de concentração do polímero aplicado nas sementes, houve desfavorecimento da variável. O valor de

máxima sobrevivência de plântulas ocorreu na concentração de 0,30% de quitosana (Figura 1).

Com relação ao comprimento de plântulas e massa da matéria fresca, o tratamento das sementes com quitosana não influenciou estas variáveis, não havendo diferença estatística entre as concentrações testadas (Figuras 2 e 3). Tal efeito pode estar relacionado ao fato de que, a quitosana, em concentrações elevadas, ative rotas metabólicas antagônicas às envolvidas no processo de germinação, ou ainda, sejam ativadas rotas de defesa de forma intensa que provocam perdas metabólicas, resultando em danos na germinação e no tamanho de plântulas.

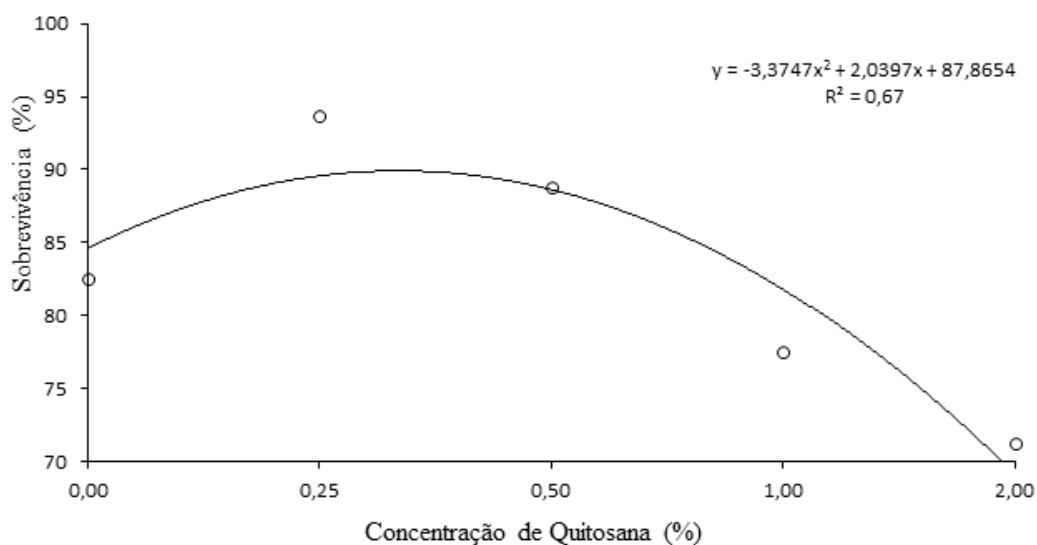


FIGURA 1 - Sobrevivência de plântulas de tomate variedade Santa Cruz em substrato inoculado com *Rhizoctonia solani*, 14 dias após incubação à temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 12 horas e umidade relativa de $70 \pm 10\%$, em função do tratamento das sementes com concentrações de quitosana.

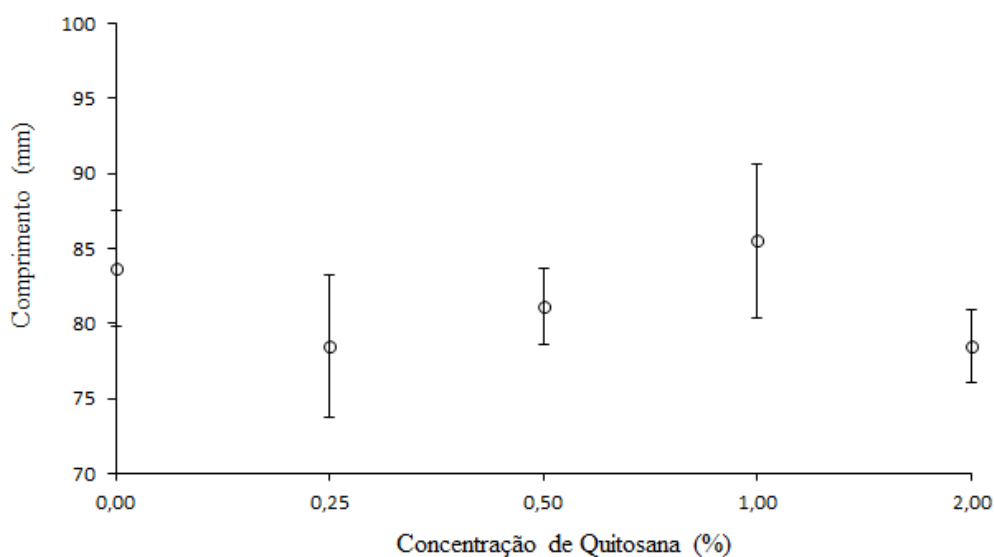


FIGURA 2 - Comprimento de plântulas de tomate variedade Santa Cruz em substrato inoculado com *Rhizoctonia solani*, 14 dias após incubação à temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 12 horas e umidade relativa de $70 \pm 10\%$, em função do tratamento das sementes com concentrações de quitosana.

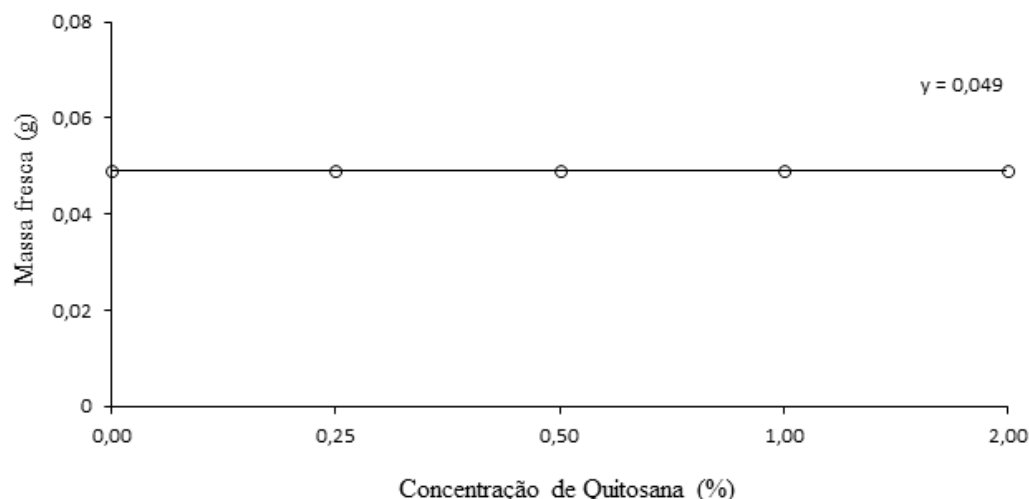


FIGURA 3 - Massa da matéria fresca de plântulas de tomate variedade Santa Cruz em substrato inoculado com *Rhizoctonia solani*, 14 dias após incubação à temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 12 horas e umidade relativa de $70 \pm 10\%$, em função do tratamento das sementes com concentrações de quitosana.

Em trabalho realizado por Di Piero et al. (2008) em plantas de feijão, a aplicação de quitosana reduziu a doença no trifólio pré-tratado (efeito local), no entanto, doses a partir de 24 mg por plantas mostraram-se fitotóxicas. Em videira cv. Chardonnay, a concentração quitosana de 2% de chitogel teve um efeito negativo no crescimento das plântulas e concentrações maiores promoveram morte das mesmas (AIT BARKA et al., 2004).

Resultados de indução de resistência no controle de fungos do solo, com uso de quitosana, já haviam sido observados em plantas de pepino com a indução de respostas de defesa, inclusive com formação de barreiras estruturais nos tecidos das raízes e o estímulo das hidrolases, contra a podridão-das-raízes causada por *Pythium aphanidermatum* (EL GHAOUTH et al., 1994).

Pastucha (2008) avaliando a aplicação de quitosana em diferentes fases de desenvolvimento de plantas de soja observou que quando a quitosana é aplicada nas sementes, nas mudas e no início do florescimento, apresentou maior eficiência em inibir infecções em comparação com a aplicação apenas no período de desenvolvimento da soja. De acordo com o autor, estas aplicações protegem as sementes germinadas das infecções por fungos do solo e o tratamento nas mudas prorroga o efeito protetor da quitosana de infecções por fitopatógenos.

Com relação às enzimas de defesa, FAL, quitinases e β -1,3-glucanases, a aplicação de quitosana às sementes de tomate na concentração de 0,25% estimulou significativamente a atividade das mesmas, em comparação com a testemunha (sem quitosana) (Figura 4). Este resultado pode ter sido importante no aumento da sobrevivência de plântulas de tomate em substrato inoculado com *R. solani*.

A FAL é considerada chave entre os metabolismos primário e secundário e precursora da rota do ácido chiquímico, via fenilpropanóides. Seus produtos são modificados em precursores de metabólitos secundários, como por exemplo: ligninas, flavonóides e

fitoalexinas que participam durante a interação da planta com o patógeno (KHAN et al., 2003; DURRANT; DONG, 2004).

A quitosana quando aplicada em plantas de soja, aumentou a atividade das enzimas FAL, e consequentemente elevou a quantidade de compostos fenólicos que estão relacionados com o fenômeno de resistência da planta a doenças (KHAN et al., 2003). Segundo Mazaro et al. (2009), o tratamento de sementes de tomate com quitosana aumentou a atividade da FAL, envolvida na rota metabólica de alguns compostos relacionados à defesa da planta, rota dos fenilpropanóides, antocianinas, flavonóides, taninos e resultou na redução do tombamento de plântulas de tomate causado por *R. solani*.

Assim como para FAL, a aplicação de quitosana na concentração de 0,25% elevou a atividade das enzimas de defesa β -1,3-glucanases e quitinases, as quais atuam diretamente sobre a parede celular do fungo, prevenindo a penetração de patógenos, por ação de degradação das quitinas e glucanas, presentes na parede celular dos patógenos (DURRANT; DONG, 2004). Desta forma, comprova-se que a aplicação de quitosana induz a resistência em plântulas de tomateiro, pela ativação das proteínas-RPs.

Aziz et al. (2006) observaram a elevação na atividade de β -1,3-glucanases em folhas de videira e tomateiro tratadas com quitosana à $300 \mu\text{g mL}^{-1}$. Esse incremento na atividade enzimática auxiliou na proteção de videira contra as doenças causadas por *Botrytis cinerea* e *Plasmopara viticola*, bem como na redução da severidade da requeima do tomate provocada por *Phytophthora infestans* (ATIA et al., 2005).

Além da indução de resistência, a quitosana pode atuar inibindo o crescimento micelial de *R. solani*. Freddo et al. (2014), em seu experimento, demonstraram que em doses de 0; 0,25; 0,50; 1,0 e 2,0% de quitosana em meio BDA, a inibição do crescimento micelial do patógeno foi de forma linear crescente, conforme o aumento da dose testada.

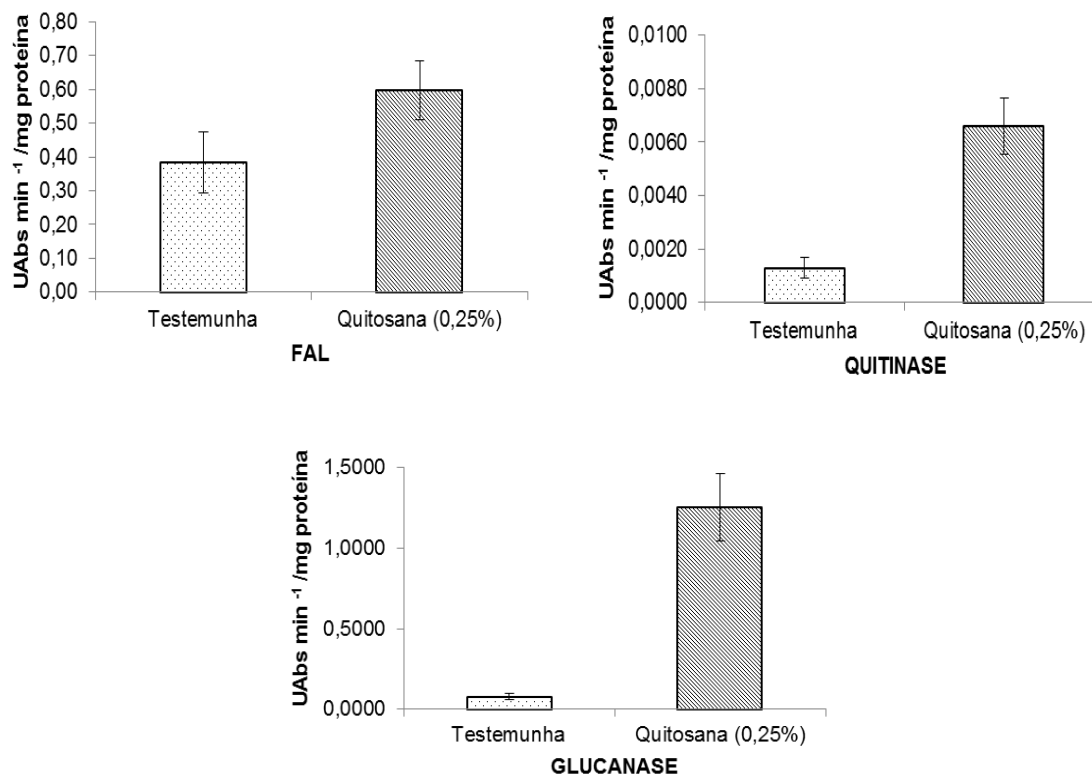


FIGURA 4 - Atividade enzimática de fenilalanina amônia-liase (FAL), quitinases e β -1,3-glucanases em plântulas de tomate variedade Santa Cruz em substrato inoculado com *Rhizoctonia solani*, 14 dias após incubação à temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 12 horas e umidade de $70 \pm 10\%$, em função do tratamento das sementes com quitosana (0,25%) ou não (testemunha).

CONCLUSÕES

A utilização de quitosana no tratamento das sementes de tomate foi favorável ao aumento da sobrevivência das plântulas em substrato inoculado com *R. solani*. Este resultado pode ser devido ao fato do tratamento das sementes com quitosana ativar mecanismos bioquímicos de resistência, expressado no trabalho pelo aumento da atividade enzimática de FAL, quitinases e β -1,3-glucanases.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIT BARKA, E.; EULLAFFROY, P.; CLÉMENT, C.; VERNET, V. Chitosan improves development, and protects *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinerea*. **Plant Cell Reports**, v.22, n.8, p.608-614, 2004.
- ATIA, M.M.M.; BUCHENAUER, H.; ALY, A.Z.; ABOU-ZAID, M.I. Antifungal activity of chitosan against *Phytophthora infestans* and activation of defence mechanisms in tomato to late blight. **Biological Agriculture and Horticulture**, v.23, n.2, p.175-197, 2005.
- AZIZ, A.; TROTEL-AZIZ, P.; DHUICQ, L.; JEANDET, P.; COURDERCHET, M.; VERNET, G. Chitosan oligomers and copper sulfate induce grapevine defense reactions and resistance to gray mold and downy mildew. **Phytopathology**, v.96, n.11, p.1188-1194, 2006.
- BEDENDO, I. Damping off. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia 1: princípios e conceitos**. 4.ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011. p.435-441.
- BHASKARA REDDY, M.V.; BELKACEMI, K.; CORCUFF, R.; CASTAIGNE, F.; ARUL, J. Effect of preharvest chitosan sprays in post-harvest infections by *Botrytis cinerea* and quality of strawberry fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.20, n.1, p.39-51, 2000.
- DEVLIEGHERE, F.; VERMEULEN, A.; DEBEVERE, J. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. **Food Microbiology**, v.21, n.6, p.703-714, 2004.
- DI PIERO, R.M.; GARDA, M.V. Quitosana reduz a severidade da antracnose e aumenta a atividade de glucanase em feijoeiro-comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.9, p.1121-1128, 2008.
- DURRANT, W.E.; DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v.42, p.185-209, 2004.
- EL GHAOUTH, A.; ARUL, J.; PONNAMPALAM, R.; BOULET, M. Chitosan coating effect on storability and quality of fresh strawberries. **Journal of Food Science**, v.56, n.6, p.1618-1620, 1992.
- EL GHAOUTH, A.; ARUL, J.; WILSON, C.; BENHAMOU, N. Biochemical and cytochemical aspects of the interactions of chitosan and *Botrytis cinerea* in bell pepper fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.12, n.2, p.183-194, 1997.
- EL GHAOUTH, A.; ARUL, J.; GRENIER, J.; BENHAMOU, N.; ASSELIN, A.; BÉLANGER, R. Effect of chitosan on cucumber plants: suppression of *Pythium aphanidermatum* and induction of defense reactions. **Phytopathology**, v.84, n.3, p.313-320, 1994.
- FREDDO, Á.R.; MAZARO, S.M.; BRUN, E.J.; WAGNER JÚNIOR, A. Efeito da quitosana na emergência, desenvolvimento inicial e caracterização bioquímica de plântulas de *Acacia mearmsii*. **Revista Árvore**, v.36, n.6, p.1039-1045, 2012.
- FREDDO, Á.R.; MAZARO S.M.; BRUN, E.J.; WAGNER JÚNIOR, A. A quitosana como fungistático no crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* Kuhn. **Ciência Rural**, v.44, n.1, p.1-4, 2014.
- GUZZO, S.D.; MARTINS, E.M.F. Local and systemic induction of β -1,3-glucanase and chitinase in coffee leaves protected against *Hemileia vastatrix* by *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Phytopathology**, v.144, n.9-10, p.449-454, 1996.
- HAMMERSCHMIDT, R.; MÉTRAUX, J.P.; VAN LOON, L.C. Inducing resistance: a summary of apers presented at the first international symposium on induced resistance to plant diseases. **European Journal of Plant Pathology**, v.107, n.9, p.1-6, 2001.

Quitosana na indução de resistência...

ROCHA, R. C. D. S. et al. (2017)

- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Sistema IBGE de recuperação automática, Sidra**. Produção Agrícola Municipal, 2008. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=740>. Acesso em: 05 mai. 2012.
- KHAN, W.; PRITHIVIRAJ, B.; SMITH, D.L. Chitosan and chitin oligomers increase phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase activities in soybean leaves. **Journal of Plant Physiology**, v.160, n.8, p.859-863, 2003.
- KUHN, O.J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção**. 2007. 138p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 2007.
- MAZARO, S.M.; WAGNER JÚNIOR, A.; SANTOS, I.; CITADIN, I.; POSSENTI, J.C.; GOUVÊA, A. Controle do tombamento de plântulas de beterraba e tomate pelo tratamento de sementes com quitosana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.11, p.1424-1430, 2009.
- NUEZ, F. **El cultivo del tomate**. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 2001. 793p.
- PASTUCHA, A. Chitosan as a compound inhibiting the occurrence of soybean diseases. **Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus**, v.7, n.3, p.41-55, 2008.
- PEREIRA, R.B.; RESENDE, M.L.V.de; RIBEIRO JÚNIOR, P.M.; AMARAL, D.R.; LUCAS, G.C.; CAVALCANTI, F.R. Ativação de defesa em cacaueiro contra a murcha-de-verticílio por extratos naturais e acibenzolar-S-metil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.2, p.171-178, 2008.
- STADNIK, M. Indução de resistência a oídios. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, Campinas, 2000. Anais do Congresso Paulista de Fitopatologia, v.23, p.176-181. 2000.
- STEPHENS, C.T.; POWELL, C.C.; SCHMITTHENNER, A.F. A method of evaluating post-emergence damping-off pathogens of breeding plants. **Phytopatology**, v.71, n.11, p.1125-1128, 1981.