

Efeito do extrato hidroalcoólico e do óleo de nim (*Azadirachta indica*) sobre o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e na resistência induzida de quiabeiros à fusariose

*Effect of hydroalcoholic neem (*Azadirachta indica*) extract and oil on the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* and in the induced resistance of okra to fusariosis*

*Efecto del extracto hidroalcohólico y el aceite de neem (*Azadirachta indica*) sobre el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* y la resistencia inducida de la okra a la fusariosis*

Recebido: 26/01/2021 | Revisado: 26/01/2021 | Aceito: 27/01/2021 | Publicado: 04/02/2021

Thiago Anchieta de Melo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0796-6388>

Universidade Estadual do Maranhão, Brasil

E-mail: thiogodemelo.uema@gmail.com

Ilka Márcia Ribeiro de Souza Serra

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1622-5434>

Universidade Estadual do Maranhão, Brasil

E-mail: ilka.tt@gmail.com

Ingrid Tayane Vieira da Silva do Nascimento

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2858-4549>

Universidade Estadual do Maranhão, Brasil

E-mail: tayanevsn@hotmail.com

Resumo

O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito do extrato hidroalcoólico e do óleo de nim sobre o crescimento micelial, esporulação, germinação e adesão de conídios do fungo *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e avaliar o efeito desses produtos na indução de resistência em quiabeiros tratados e, posteriormente, inoculados com o fungo, por meio da atividade de enzimas antioxidantes relacionadas com processos de defesa vegetal. Os resultados evidenciaram que tanto o extrato quanto o óleo de nim foram eficientes em inibir o crescimento micelial e esporulação do fungo. Além disso, houve inibição da germinação e fixação de conídios produzidos na presença dos produtos. O extrato e o óleo de nim reduziram a severidade da doença nos quiabeiros, medida pelo índice de infecção da doença. Além disso, incrementos significativos das enzimas guaiacol-peroxidase, polifenoloxidase, superóxido-dismutase e catalase foram observados nos quiabeiros tratados com os produtos, sendo estes aumentos, diretamente proporcionais aos aumentos das concentrações utilizadas. Assim, tanto o extrato quanto o óleo de nim têm efeitos diretos sobre o desenvolvimento do fungo *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e induzem resistência em quiabeiros a partir da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs).

Palavras-chave: *Abelmoschus esculentus*; EROs; Murcha; SAR.

Abstract

The objective of this work was to verify the effect of hydroalcoholic extract and neem oil on mycelial growth, sporulation, germination, and conidia adhesion of the fungus *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. Also, to evaluate the effect of the extract and oil mentioned in the induction of resistance in treated okra trees and, later, inoculated with the fungus, through the activity of antioxidant enzymes related to plant defense processes. The results showed that both the extract and the neem oil were efficient in inhibiting mycelial growth and sporulation of the fungus. In addition, there was inhibition of germination and fixation of conidia produced in the presence of the products. Neem extract and oil reduced the severity of the disease in okra, as measured by the disease's infection rate. In addition, significant increases in the enzymes guaiacol-peroxidase, polyphenoloxidase, superoxide dismutase and catalase were observed in the okra treated with the products, these increases being directly proportional to the increases in the concentrations used. Thus, both the extract and the neem oil have direct effects on the development of the fungus *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* and induce resistance in okra from the formation of reactive oxygen species (ROS).

Keywords: *Abelmoschus esculentus*; ROS; Wilt; SAR.

Resumen

El objetivo de este trabajo fue verificar el efecto del extracto hidroalcohólico y el aceite de neem sobre el crecimiento micelial, la esporulación, la germinación y la adhesión de conidios del hongo *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* y evaluar el efecto de estos productos sobre la inducción de resistencia en árboles de okra tratados y, posteriormente, inoculados con el hongo, mediante la actividad de enzimas antioxidantes relacionadas con los procesos de defensa de las plantas. Los resultados mostraron que tanto el extracto como el aceite de neem eran eficientes para inhibir el crecimiento micelial y la esporulación del hongo. Además, hubo inhibición de la germinación y fijación de conidios producidos en presencia de los productos. El extracto y el aceite de neem redujeron la gravedad de la enfermedad en la okra, medida por la tasa de infección de la enfermedad. Además, se observaron incrementos significativos de las enzimas guayacol-peroxidasa, polifenoloxidasas, superóxido dismutasa y catalasa en la okra tratada con los productos, siendo estos incrementos directamente proporcionales a los incrementos en las concentraciones utilizadas. Así, tanto el extracto como el aceite de neem tienen efectos directos sobre el desarrollo del hongo *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e inducen resistencia en la okra a partir de la formación de especies reactivas de oxígeno (EROs).

Palabras clave: *Abelmoschus esculentus*; EROs; Marchito; SAR.

1. Introdução

O quiabeiro (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench), é uma hortaliça de ciclo anual, de fácil cultivo e bastante plantada e disseminada pelo Brasil, especialmente na região Nordeste. Trata-se de uma espécie vegetal que apresenta características desejáveis, especialmente, pelos pequenos produtores, uma vez que é uma planta com boa resistência à seca e bem adaptada ao clima tropical brasileiro (Santos et al., 2020). A cultivar mais plantada no país, atualmente, é a Santa Cruz 47, pois sendo bem adaptada às regiões de cultivo, apresenta um ciclo curto e tem boa produção de frutos que são amplamente aceitos no mercado consumidor interno (Moura & Guimarães, 2014; Mota et al., 2017; Carvalho et al., 2020).

O quiabo é uma hortaliça-fruto originária da Etiópia, pertence à família Malvaceae e foi introduzida no Brasil a partir do povo africano. Desenvolve-se bem em regiões de clima quente, entre 18 °C e 35 °C, fato que favorece também a ocorrência e o desenvolvimento de doenças (Filgueira, 2008), como a Fusariose, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* Snyder & Hansen.

O gênero *Fusarium* contém algumas das espécies de fungos fitopatogênicos mais importantes para a agricultura mundial (Dean et al., 2012). Outras espécies do gênero são, reconhecidamente, importantes produtoras de micotoxinas e, ainda outras, estão se tornando preocupantes patógenos para humanos (Cilo et al., 2015; van Diepeningen & Hoog, 2016; Hof, 2020). A espécie *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* é responsável pela murcha do quiabeiro e algodoeiro, configurando-se como um dos problemas mais sérios nessas culturas.

O fungo é um patógeno que tem como habitat o solo, sendo capaz produzir estruturas de resistência, os clamidósporos, que ficam dormentes nesse ambiente por longos períodos, dificultando, dessa forma, as medidas de manejo da doença voltadas à redução do inóculo inicial. Assim, quando as condições são favoráveis e há hospedeiro disponível, os clamidósporos germinam sobre as raízes das plantas e a hifa fúngica penetra diretamente ou por meio de ferimentos no hospedeiro. Esses ferimentos são gerados, muitas vezes, pela infecção prévia da planta por nematoides do gênero *Meloydogine* Goeldi. Infecções mistas causadas pelo nematoide das galhas e pelo fungo já foram descritas para outras hortaliças como o tomateiro, a pimenteira e plantas de pimentão, todas da família Solanaceae e, em plantas de algodão e milho (Kamali et al., 2015; Tahir et al., 2017; Terra et al., 2017; Schiwek et al., 2020).

As infecções causadas por *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* se dão na raiz principal da planta, radículas ou pelos absorventes e, processa-se de modo direto através da superfície do hospedeiro ou de ferimentos presentes na planta. A colonização dos quiabeiros infectados acontece por meio do crescimento intercelular das hifas do fungo em direção aos vasos do xilema. Assim, o patógeno permanece, praticamente, confinado ao xilema e, a partir desse momento, distribui-se por toda a planta por meio do crescimento de hifas ou pela produção de conídios, que são arrastados pelo fluxo direcionado da seiva bruta, da base da planta até o ápice. Com a evolução da doença, há obstrução e escurecimento dos vasos xilemáticos. A

obstrução é consequência do acúmulo de micélio, conídios, gomas e tiloses, bem como de constrição do vaso, provocada pela proliferação de células adjacentes que compõem o tecido do parênquima. O escurecimento dos vasos é atribuído ao transporte de substâncias resultantes da oxidação e polimerização de compostos fenólicos. O sintoma de murcha surge, então, como consequência do bloqueio dos vasos, impedindo que a água absorvida pelo sistema radicular supra adequadamente a parte aérea da planta (Bedendo, 2011).

Tanto por ser um patógeno de solo quanto pelo local de infecção, o fungo *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* é difícil de ser controlado. A medida de manejo da doença mais eficiente é o emprego de variedades resistentes, obtidas a partir de programas de melhoramento genético. Contudo, para o quiabeiro, esta não é uma opção disponível. Medidas de controle cultural que envolvem a rotação de culturas, uso de plantas antagônicas com propriedades fungistática ou fungicida e aração profunda do solo, todas voltadas para a redução do inóculo inicial, minimizam os danos da doença (Mielniczuk & Skwaryło-Bednarz, 2020). Além das medidas de controle já citadas, nos últimos anos, a utilização de extratos de plantas com efeito sobre fitopatógenos desponta como alternativa promissora (Gurjar et al., 2012). Essa ideia objetiva, principalmente, desenvolver alternativas ao uso indiscriminado de agrotóxicos e diminuir a dependência dos sistemas de produção a esses produtos. Nesse contexto, extratos e óleos derivados de nim (*Azadirachta indica* A. Juss) são amplamente empregados (Gupta et al., 2017).

Não apenas na fitopatologia, mas também em outras áreas, preparações feitas a partir de partes da árvore de nim ou, simplesmente, o plantio do vegetal, já demonstraram capacidade de mitigar danos causados por doenças agudas e crônicas em diversas regiões da África e da Ásia. As utilidades dessa planta vão além da sua capacidade repelente contra mosquitos vetores de vírus causadores de febre, reportada em 1803 (James & Lond, 1903). Pelas diversas capacidades que o nim tem, há registros na literatura que descrevem a árvore como “a farmácia do vilarejo”, “a farmácia da natureza”, “cura tudo” e “uma planta para todas as doenças” (Siddiqui et al., 1986; Biswas et al., 2002; Subapriya & Nagini, 2005; Gupta et al., 2017; Doshi et al., 2020).

O nim é uma planta considerada o armazém de inúmeras moléculas fitoquímicas. Até o momento, mais de 300 fitomoléculas com propriedades diversas já foram isoladas da planta (Biswas et al., 2002; Siddiqui et al., 1986; Subapriya & Nagini, 2005; Gupta et al., 2017). Os dois grupos de moléculas químicas extraídas da planta, especialmente das folhas, com maior frequência, são os isoprenoides e os não-isoprenoides. Dentre os isoprenoides mais comuns, estão os diterpenoides, os triterpenoides, as vilasininas, os limonoides e as C-secomeliacinas. Dentre os não-isoprenoides isolados da planta, figuram proteínas, polissacarídeos, compostos sulfatados, polifenóis, dihidrochalconas, coumarinas, taninos e compostos alifáticos (Akhila & Rani, 1999; Biswas et al., 2002; Brahmachari, 2004). Ao triterpenoide nimbin são atribuídas inúmeras características de atividade biológica da planta, dentre elas, o potencial anti-inflamatório, antisséptico, fungicida, anti-histamínico e antipirético. Algumas outras moléculas derivadas do nim incluem o numbolide, a azaractina, o azadirone, o azadiadirine e o gedunin.

Muitos trabalhos apontam para o potencial que o nim apresenta enquanto indutor dos mecanismos de resistência das plantas a doenças diversas (Paul & Sharma, 2002; Guleia & Kumar, 2006; Wang et al., 2010; Bhuvaneswari et al., 2012; Matiello et al., 2016; Siah et al., 2018; Sampaio et al., 2020). A indução de resistência é a técnica de manejo de doenças em plantas focada nas potencialidades de defesa do hospedeiro, onde, a partir da aplicação de um agente indutor (biótico ou abiótico), a planta tem seus mecanismos de defesa ativados (estruturais e/ou bioquímicos) podendo, dessa forma, retardar ou, até mesmo, impedir a infecção. Tal fenômeno foi verificado em cevada, quando da aplicação de extratos aquosos de nim para o controle de estrias foliares geradas pelo fungo *Drechslera graminia* (Paul & Sharma, 2002). Os ensaios demonstraram que o extrato da planta aumentou significativamente a atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase (FAL) e tirosina amônia-liase (TAL) nas folhas tratadas, de forma tão eficiente quanto o que foi observado em folhas tratadas com o fungicida carbendazim. O tratamento prévio de plantas de gergelim com o extrato aquoso de folhas de nim, aumentou a resistência da planta, principalmente no que diz respeito a atividade das enzimas FAL e peroxidase (POX) e diminuição da severidade da doença

causada pelo fungo, *Alternaria sesami* (Guleria & Kumar, 2006). O tratamento de mudas de tomateiros com extratos aquosos de nim reduziu a incidência do fungo *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* nas plantas em até 25,5%, além de promover o aumento da atividade das enzimas antioxidantes POX, catalase (CAT) e superóxido-dismutase (SOD), relacionadas com a defesa do vegetal (Hanaa et al., 2011).

Diante do exposto, ficam claras as potencialidades que as plantas de nim têm de serem aplicadas ao manejo de doenças importantes na agricultura. Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar o efeito do extrato hidroalcoólico e do óleo de nim sobre o crescimento micelial, esporulação, germinação e adesão de conídios do fungo *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e avaliar o efeito desses produtos na indução de resistência em quiabeiros tratados e, posteriormente, inoculados com o fungo, por meio da atividade de enzimas antioxidantes relacionadas com processos de defesa vegetal.

2. Metodologia

Os ensaios descritos a seguir foram realizados no Laboratório de Fitopatologia e seus anexos, pertencentes à Universidade Estadual do Maranhão, Campus São Luís.

2.1 Obtenção do isolado e sementes de quiabeiro

O isolado patogênico do fungo *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* foi obtido a partir de quiabeiros sintomáticos. Assim, após a retirada das plantas do substrato de plantio, estas foram seccionadas de modo transversal para a observação do sistema vascular. Plantas com sistema vascular escurecido foram levadas ao laboratório e, fragmentos da região sintomática foram retirados e submetidos à tríplice lavagem (hipoclorito de sódio [3:1], álcool 50% e água destilada), sendo, em seguida, transferidos para placas de Petri contendo meio de cultivo BDA (batata-dextrose-ágar) e incubados.

A partir das colônias puras obtidas, uma suspensão de conídios (10^{-5} conídios mL⁻¹) foi preparada e inoculada em quiabeiros previamente cultivados em casa-de-vegetação. Após o surgimento dos sintomas de murcha, as plantas foram novamente levadas ao laboratório e procedeu-se o reisolamento do patógeno, conforme descrito anteriormente. Após a obtenção de nova cultura pura, o isolado foi preservado durante todo o experimento.

Os quiabeiros foram obtidos a partir de sementes não tratadas, fornecidas por produtores familiares de quiabo da Ilha de São Luís. Estas foram utilizadas em todos os ensaios realizados com plantas, descritos neste trabalho.

2.2 Obtenção do extrato hidroalcoólico, do óleo de nim e concentrações utilizadas

O extrato hidroalcoólico foi obtido a partir da trituração de 5,0 g de folhas frescas de nim em 100 mL de etanol 0,05%. Após a preparação da suspensão, esta foi posta em repouso, no escuro, por 48 h, sendo, após esse período, levada ao evaporador rotativo por 4 h. Finalmente, o preparado foi triplamente filtrado em filtro de porcelana recoberto com papel de filtro nº 40 e após, em filtros de membrana MF-Millipore acoplados a uma seringa.

O óleo de nim utilizado nos ensaios foi obtido comercialmente da empresa Neemseto Brasil®, sendo este um produto registrado como inseticida natural e 100% puro.

As concentrações utilizadas, em todos os ensaios realizados para os dois produtos testados, foram: 0,0%, 0,25%, 0,5%, 0,75% e 1,0%. Os testes foram realizados de modo independente para cada um dos produtos e a concentração zero representou o controle negativo dos ensaios.

2.3 Testes *in vitro*

Ao meio de cultivo BDA fundente, foram adicionadas cada umas das concentrações dos produtos estabelecidas. Após homogeneização do preparado, este foi vertido em seis placas de Petri por tratamento que, após solidificação do meio,

receberam discos de micélio de 5 mm de diâmetro contendo estruturas do fungo *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. Finalizada a repicagem do patógeno, as placas foram incubadas em câmara tipo B.O.D., ajustada para a temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 h. Diariamente, as placas foram avaliadas quanto ao crescimento micelial do patógeno, sendo medidas em sentidos diametralmente opostos. A avaliação do crescimento micelial finalizou sete dias após a repicagem, quando em uma das parcelas experimentais o micélio atingiu o bordo da placa, sendo assim, determinado o crescimento micelial total (em mm) do fungo com os valores obtidos no penúltimo dia de medição.

Após a análise do crescimento micelial, quatro placas de cada um dos tratamentos foram inundadas com 20 mL de água destilada e autoclavada (ADA) e raspadas com um pincel de cerdas macias para a retirada dos conídios produzidos pelo fungo, a fim de que se determinasse a esporulação do patógeno, sendo esta determinada pelo número de conídios 10^5 mL⁻¹.

A germinação dos conídios do fungo foi determinada pela preparação de suspensões de conídios com placas oriundas de cada um dos tratamentos, sendo as concentrações dessas suspensões, ajustadas para 10^5 conídios mL⁻¹. Após ajuste da concentração dos propágulos, 20 mL das preparações foram vertidos em placas de Petri de poliestireno, previamente marcadas com 25 campos de área medindo 1 mm² cada, sendo estas, em seguida, incubadas em câmaras tipo B.O.D., a uma temperatura média de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 h, por 24 h. Transcorrido esse período, a suspensão de conídios foi descartada e, com auxílio de microscopia de luz, 50 conídios por campo marcado foram contados e separados em: (A) conídios germinados, com tubo germinativo maior do que o comprimento do propágulo; (B) conídios não germinados ou com tubo germinativo menor do que o comprimento do propágulo. Foram considerados no ensaio macro e microconídios, sendo contados 4 campos da placa, totalizando 200 conídios por parcela. A porcentagem de conídios germinados foi determinada segundo a fórmula abaixo:

$$\% \text{ de conídios germinados} = \frac{\Sigma A * 100}{\Sigma (A+B)}$$

Em que ‘ ΣA ’ representa o somatório do número de conídios germinados e ‘ $\Sigma (A+B)$ ’ representa o somatório número total de conídios contados na parcela (Melo, 2017).

A interferência dos produtos sobre a capacidade de adesão dos conídios de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* foi determinada utilizando a mesma técnica das placas marcadas. Para isso, suspensões de conídios foram preparadas a partir das placas de crescimento do patógeno nas diferentes concentrações dos produtos, sendo ajustadas para 10^5 conídios mL⁻¹. Após ajuste da concentração dos propágulos para 10^5 conídios mL⁻¹, 20 mL das preparações foram vertidos em placas de Petri de poliestireno, previamente marcadas com 25 campos de área medindo 1 mm² cada, sendo estas, em seguida, incubadas em câmaras tipo BOD, a uma temperatura média de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 h, por 24 h. Após esse período, cinco campos tiveram todos os conídios contados por duas vezes, sendo: (A) contagem dos conídios antes e (B) após a lavagem das placas, por 5 s, em água corrente. A porcentagem de conídios aderidos foi calculada segundo a fórmula abaixo:

$$\% \text{ de conídios aderidos} = \frac{B * 100}{A}$$

Em que ‘A’ representa o número de conídios na contagem A e ‘B’ representa o número de conídios na contagem B (Melo, 2017).

2.4 Testes *in vivo*

Os testes *in vivo* foram realizados em condições de casa-de-vegetação. Para isso, sementes que quiabeiro, cultivar Santa Cruz 47, não tratadas, foram semeadas em vasos de 1 Kg contendo o substrato comercial Plantmax Hortaliças® mais solo

autoclavado, na proporção de 2:1. Após 20 dias, os quiabeiros foram tratados com as diferentes concentrações dos produtos, por meio de aspersão foliar. Nestes testes, além do controle negativo aplicado (plantas pulverizadas com água – concentração zero), foi utilizado também um controle positivo com o acibenzolar-S-metílico (ASM - Bion[®]), na concentração de 50 mg do i.a. L⁻¹. Foram utilizadas 5 repetições por tratamento, sendo a parcela experimental composta por duas plantas por vaso.

Após 24 h da aplicação dos tratamentos, os quiabeiros foram inoculados com 20 mL de suspensão de conídios, calibrada para 10⁶ conídios mL⁻¹, por meio da técnica do fermento em meia lua no colo da planta, proposta por Menezes e Assis (2004).

A severidade da doença nas plantas foi avaliada 15 dias após a inoculação do fungo, a partir de adaptação da escala de notas proposta por Cia et al. (1977). Segundo o autor, a murcha de *Fusarium* apresenta cinco graus de agressividade, expressos na sintomatologia da seguinte maneira: (1) plantas sem sintomas de murcha, com vasos condutores de seiva não escurecidos, examinados através do corte na base do caule; (2) plantas com vasos escurecidos, com coloração marrom no primeiro terço do caule e presença de folhas; (3) plantas com vasos escurecidos até o segundo terço do caule e presença de algumas folhas; (4) plantas com os vasos condutores totalmente escurecidos, com ou sem folhas; (5) plantas mortas e com os vasos condutores de seiva totalmente escurecidos.

As notas atribuídas a cada uma das parcelas serviram para o cálculo do índice de infecção ou índice de McKinney (1923), calculado segundo a fórmula:

$$\text{Índice de Infecção} = \frac{\sum(\text{grau da escala} \times \text{freqüência})100}{(\text{n}^\circ \text{ total de unidades} \times \text{grau máximo da escala})}$$

2.5 Análises enzimáticas

Para a determinação da atividade antioxidante dos tratamentos aplicados, 1 g de folhas de cada uma das parcelas experimentais foi coletada. Os testes foram realizados a partir da obtenção do extrato proteico e avaliação da atividade das enzimas guaiacol-peroxidase (POX), polifenoloxidase (PFO), superóxido-dismutase (SOD) e catalase (CAT). Todos os testes descritos a seguir foram realizados em triplicata.

O extrato proteico para a realização dos testes bioquímicos foi obtido a partir da maceração de 1,0 g de folha fresca do quiabeiro, coletada 15 dias após a inoculação do patógeno, de cada parcela experimental, na presença de nitrogênio líquido, seguida da adição de 4,0 mL de tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 6,0). Sendo, em seguida, o homogenato centrifugado a 20.000 g por 25 min, a 4 °C. Os sobrenadantes obtidos foram utilizados para a determinação da atividade das enzimas antioxidantes.

A atividade da POX foi determinada espectrofotometricamente, a 470 nm, em reação que consistiu de: 2,9 mL do tampão de reação (tampão fosfato de sódio 10 mM [pH 6,0], guaiacol 2,3 mM e H₂O₂ a 2,9 mM) e 0,1 mL do extrato proteico preparado em tampão fosfato. Os resultados foram expressos em $\Delta \text{abs}_{470\text{nm}} \text{ min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$, segundo protocolo proposto por Roncatto e Pascholati (1998).

A atividade da PFO foi determinada pela conversão do catecol em quinona, onde 900 μL de catecol a 20 mM, preparado em tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 6,8), foi acrescida em 100 μL de extrato proteico preparado em tampão fosfato (pH 5,0). A reação foi monitorada por 1 min, sendo as medidas das absorvâncias registradas a cada 6 s, sendo, o comprimento de onda utilizado, 420 nm. Os resultados obtidos foram então, expressos em $\Delta \text{abs}_{420\text{nm}} \text{ min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$ (Duangmal & Apenten, 1999).

A atividade da SOD foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Gupta et al. (1993), adaptada por Beltrame (2010). Assim, 200 μL de extrato proteico, preparado em tampão fosfato, foi acrescido de 1,0 mL de uma mistura de reação composta de: tampão fosfato de potássio 5 mM (pH 7,4); metionina 9,9 mM; azul de nitrotetrazolium 57 μM (NBT);

0,025% de Triton X-100. Após, ao homogenato, foi acrescido 100 µL de riboflavina 44 mM. A atividade da SOD foi calculada segundo Asada et al. (1974), através da determinação da razão entre as absorvâncias de cada amostra. Nas condições do ensaio, uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotoredução do NBT. Os resultados do teste foram expressos em unidades de SOD mg de proteína⁻¹.

Por fim, a reação para a determinação da atividade da CAT consistiu em uma mistura composta por 1,45 mL de H₂O₂ em tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 6,8), sendo que a reação foi iniciada pela adição de 50 µL de extrato proteico, preparado em tampão fosfato. As medidas de redução da absorvância foram tomadas a 240 nm. Os resultados foram expressos em unidades de CAT mg de proteína⁻¹, onde uma unidade de CAT correspondeu à decomposição de 1 µmol de H₂O₂ min⁻¹, nas condições em que estes testes foram realizados (Beers & Sizer, 1952).

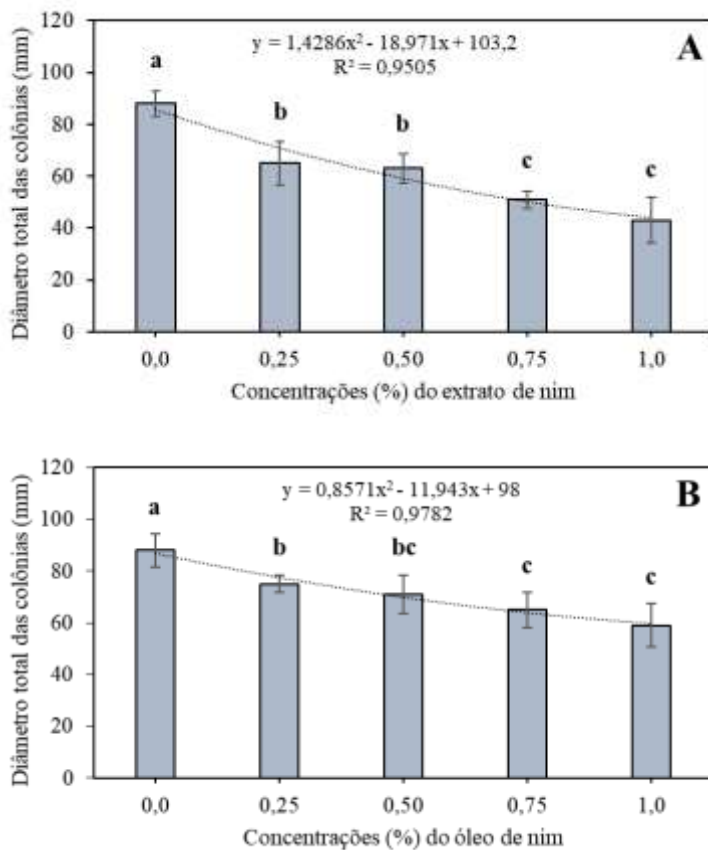
2.6 Delineamento experimental e análises estatísticas

Todos os ensaios descritos acima foram realizados em delineamento inteiramente casualizado e os dados coletados, analisados por meio do cálculo das médias, submetidas à análise de variância e comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Além disso, a correlação das concentrações dos produtos utilizados *versus* o parâmetro analisado, foi determinada a partir de análise de regressão polinomial, sendo considerados valores altamente correlacionados nos casos em que $R^2 \geq 0,70$ (Toledo & Ovalle, 2008).

3. Resultados

A avaliação do crescimento total do micélio do fungo *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* demonstrou que tanto as concentrações do extrato, quanto as concentrações do óleo, interferem de modo significativo sobre o crescimento do patógeno. Para os dois produtos, todos os tratamentos afetaram negativamente o desenvolvimento do fungo e, quanto maiores foram as concentrações utilizadas, menores foram os diâmetros das colônias observados. Assim, os aumentos das concentrações do extrato de nim implicam em diminuições no desenvolvimento do agente causal de murcha em quiabeiros (Figura 1).

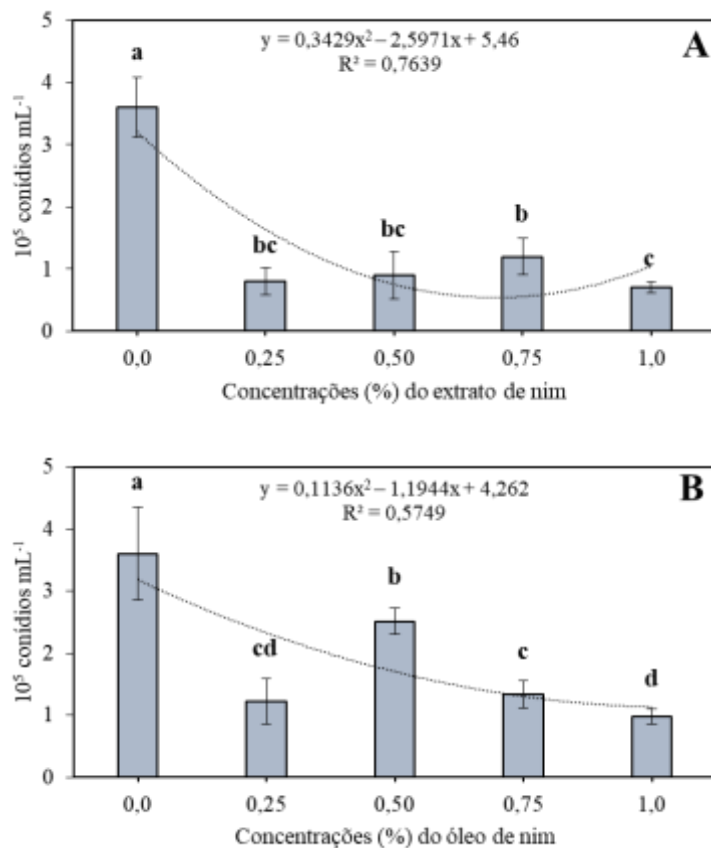
Figura 1. Crescimento micelial total, em milímetros (mm), do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* crescido em meio de cultivo BDA, acrescido de diferentes concentrações do extrato (A) e do óleo (B) de nim. As letras minúsculas iguais sobre as colunas, dentro de um mesmo gráfico, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média.



Fonte: Dados da pesquisa.

Houve efeito significativo das concentrações do extrato e do óleo de nim sobre a esporulação do fungo, uma vez que se observou que em todos os tratamentos diminuiu o número de macro e microconídios produzidos por *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em relação ao controle (concentração 0) (Figura 2). Com relação ao extrato de nim, aumentos progressivos da concentração do produto implicaram em diminuição também progressiva da esporulação. O mesmo padrão não pode ser observado nos tratamentos com o óleo de nim, em que fungos crescidos nas placas que continham 0,50% do óleo, esporularam significativamente mais que o fungo crescido na concentração de 0,25% e demais concentrações utilizadas, não seguindo, portanto, a lógica observada no ensaio com o extrato (Figura 2).

Figura 2. Esporulação do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* crescido em meio de cultivo BDA, acrescido de diferentes concentrações do extrato (A) e do óleo (B) de nim. As letras minúsculas iguais sobre as colunas, dentro de um mesmo gráfico, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média.

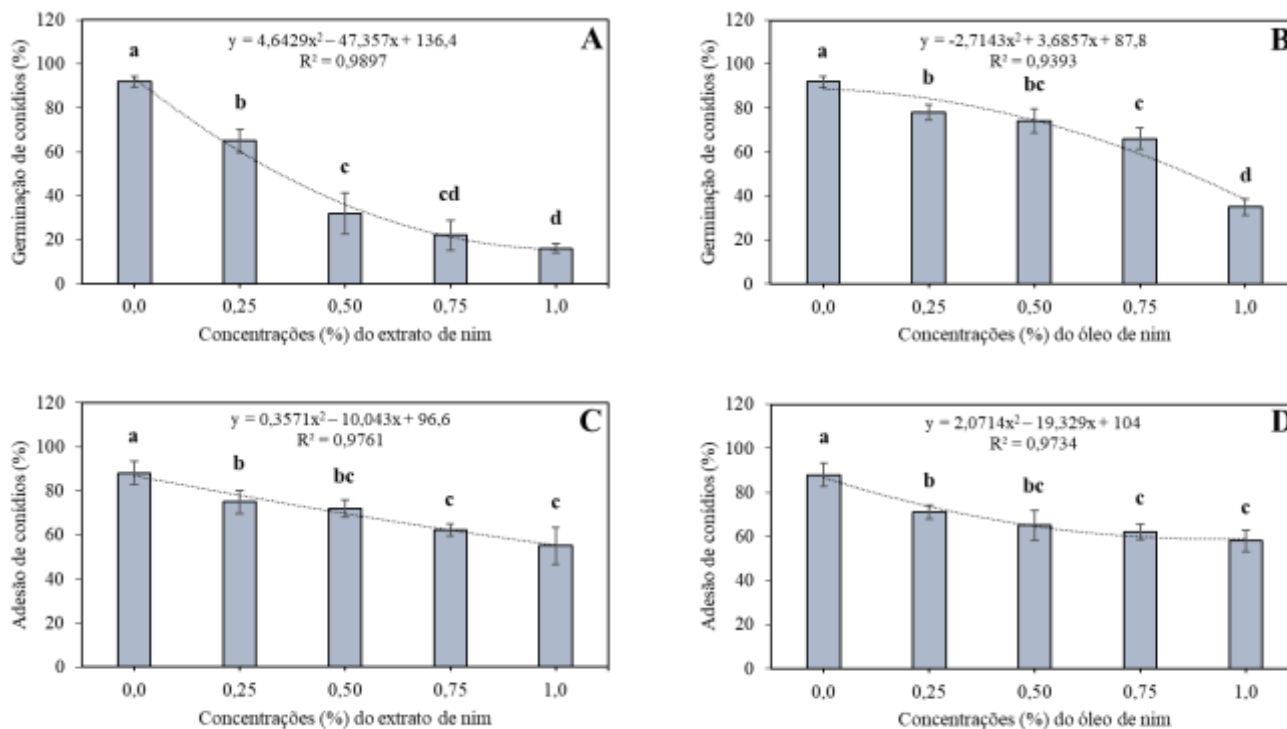


Fonte: Dados da pesquisa.

Em relação à capacidade de germinação dos propágulos infectivos do fungo *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, foi verificado que tanto o extrato quanto o óleo de nim interferem significativamente sobre este parâmetro. Nos dois casos, quanto maior a concentração dos produtos utilizada, menor foi o percentual de conídios germinados. Além disso, pelos ensaios, pode-se aferir que aumentos progressivos das concentrações implicaram em diminuições, também progressivas, da capacidade de germinação dos conídios do patógeno, sendo esse fato mais pronunciado em conídios produzidos na presença da concentração de 1,0% do extrato e do óleo, segundo observado nos ensaios realizados nas condições aqui definidas (Figuras 3A e 3B).

As concentrações tanto do extrato quanto do óleo diminuíram, significativamente, a capacidade de adesão dos conídios germinados do agente causal da fusariose em quiabeiros. Para o extrato e para o óleo de nim foi verificado que o patógeno se fixou menos às placas de poliestireno quando a produção do propágulo se deu na presença de qualquer um dos tratamentos utilizados, em comparação ao controle (dose 0). Aumentos progressivos das concentrações do extrato e do óleo de nim implicaram em diminuições, também progressivas, da capacidade de adesão dos conídios do patógeno, especialmente nas concentrações de 0,75% e 1,0%, utilizadas para ambos os produtos. Esses dados estão representados nas Figuras 3C e 3D abaixo.

Figura 3. Germinação (A e B) e adesão (C e D) de conídios do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* crescido em meio de cultivo BDA, acrescido de diferentes concentrações do extrato (A e C) e do óleo (B e D) de nim. As letras minúsculas iguais sobre as colunas, dentro de um mesmo gráfico, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média.



Fonte: Dados da pesquisa.

Com relação à severidade da doença nos quiabeiros tratados com os produtos e inoculados com o fungo, houve redução significativa dos sintomas observados, em relação ao controle, em todos os tratamentos utilizados. Nas plantas tratadas com o extrato de nim, houve redução do índice de infecção de 13,47%, 24,16%, 28,97% e 41,42%, nas plantas pulverizadas, respectivamente, com as concentrações 0,25%, 0,50%, 0,75% e 1,0% em relação ao controle negativo (plantas pulverizadas com água). A concentração de 1,0% merece destaque, uma vez que reduziu o índice de infecção nas plantas tratadas não apenas em relação ao controle negativo (concentração zero), mas também em relação às plantas tratadas com o ASM, controle positivo utilizado nos ensaios (Tabela 1).

Nos quiabeiros tratados com as diferentes concentrações do óleo de nim, foram observadas reduções no índice de infecção, em relação às plantas do controle negativo, de 20,72%, 32,83%, 40,39% e 47,55%, para as concentrações 0,25%, 0,50%, 0,75% e 1,0%, respectivamente. As duas maiores concentrações do óleo de nim (0,75% e 1,0%) diferiram significativamente, também, do controle promovido pelo ASM, uma vez que apresentaram plantas com os menores índices de infecção observados no ensaio. Esses resultados estão representados na Tabela 1, que segue.

Tabela 1. Índice de infecção e análise de variância dos quiabeiros tratados com o extrato e com o óleo de nim e com o ativador de plantas, acibenzolar-S-metílico (ASM).

Extrato de Nim			
Concentrações (%) + ASM	Índice de Infecção (%) ¹	Análise de Variância ²	Redução do Índice de Infecção em Relação ao Controle Negativo (%) ³
0,0	87,45±3,66	a	-
0,25	75,23±5,22	b	13,97
0,50	66,32±7,89	bc	24,16
0,75	62,12±6,32	c	28,97
1,0	51,23±4,73	d	41,42
ASM	66,32±3,62	bc	24,16
Óleo de Nim			
Concentrações (%) + ASM	Índice de Infecção (%) ¹	Análise de Variância ²	Redução do Índice de Infecção em Relação ao Controle Negativo (%) ³
0,0	87,45±3,66	a	-
0,25	69,33±4,56	b	20,72
0,50	58,74±8,74	bc	32,83
0,75	52,13±5,96	c	40,39
1,0	45,87±7,32	c	47,55
ASM	66,32±6,33	b	24,16

¹Valores médios acompanhados do erro padrão da média.

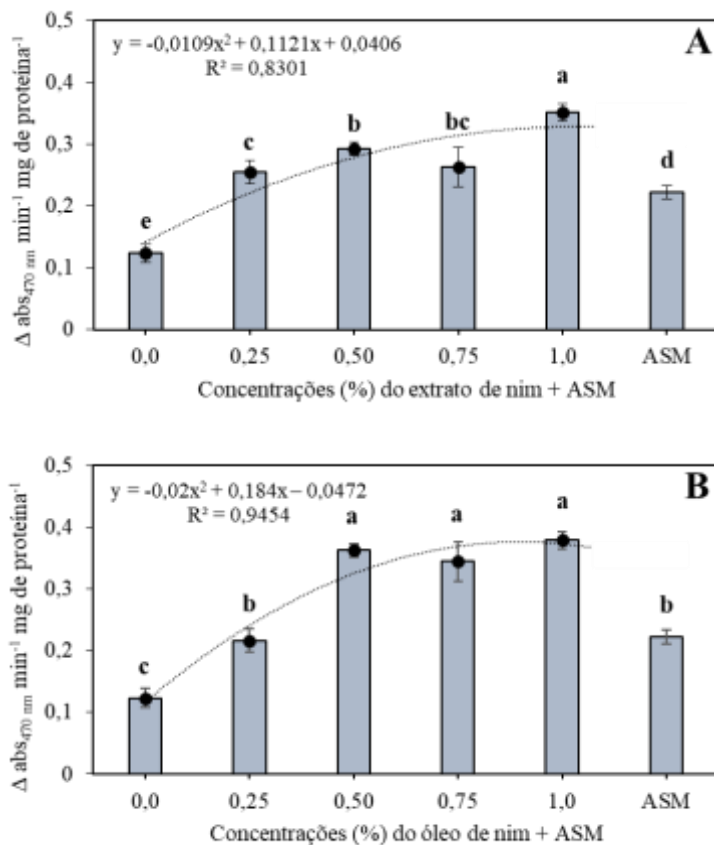
²Letras iguais na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

³Redução percentual do índice de infecção em relação ao valor observado no controle negativo (concentração zero).

Fonte: Dados da pesquisa.

A capacidade de indução de resistência do extrato e do óleo de nim foi medida pela atividade das enzimas antioxidantes guaiacol-peroxidase (POX), polifenoloxidase (PFO), superóxido-dismutase (SOD) e catalase (CAT). Os ensaios realizados demonstraram que houve alta atividade antioxidante em quiabeiros tratados com as diferentes concentrações do extrato e do óleo de nim e, posteriormente inoculados com o fungo *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, indicando resistência induzida nas plantas mediada pelos produtos. A avaliação da atividade da POX evidenciou alta atividade da enzima, em todas as concentrações utilizadas quando comparadas ao controle negativo. Todas as concentrações do extrato foram, significativamente, superiores à indução da enzima promovida pelo ASM. Nos tratamentos com o óleo de nim, somente as plantas tratadas com a concentração de 0,25% não diferiram do controle positivo. Para os dois produtos, aumentos progressivos da concentração resultaram em aumentos também progressivos da atividade da POX, como pode ser observado pela análise de regressão polinomial aplicada apenas aos tratamentos com concentrações progressivas do extrato e do óleo de nim (Figura 4).

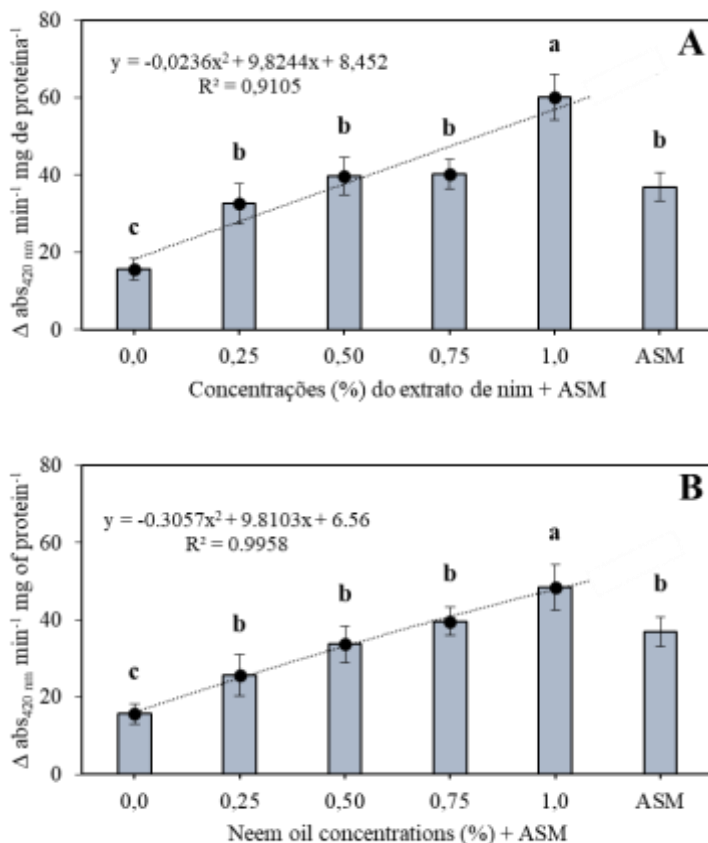
Figura 4. Atividade da enzima guaiacol-peroxidase (POX), expressa em $\Delta_{\text{abs}470\text{nm}} \text{ min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$, em quiabeiros tratados com diferentes concentrações do extrato (A) e do óleo (B) de nim e posteriormente inoculados com o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. As letras minúsculas iguais sobre as colunas, dentro de um mesmo gráfico, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média.



Fonte: Dados da pesquisa.

A atividade da enzima PFO também foi fortemente influenciada nos quiabeiros, pela aplicação das diferentes concentrações dos produtos. Para o extrato e para o óleo de nim, verificou-se que todas as concentrações diferiram significativamente do controle negativo (concentração zero), mas somente a concentração de 1,0%, para os dois produtos, foi mais eficiente em incrementar a atividade da PFO nos quiabeiros tratados que o tratamento com o ASM. Para os dois produtos é possível afirmar, também, que concentrações crescentes induzem incrementos também crescentes da atividade da enzima (Figura 5).

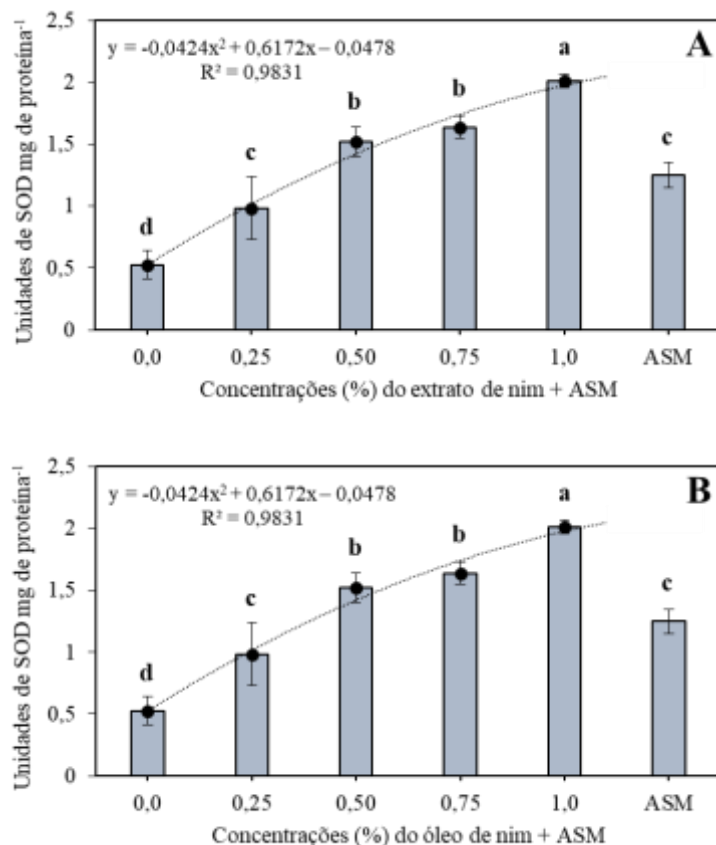
Figura 5. Atividade da enzima polifenoloxidase (PFO), expressa em $\Delta_{\text{abs}420\text{nm}} \text{ min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$, em quiabeiros tratados com diferentes concentrações do extrato (A) e do óleo (B) de nim e posteriormente inoculados com o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. As letras minúsculas iguais sobre as colunas, dentro de um mesmo gráfico, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média.



Fonte: Dados da pesquisa.

Todas as concentrações utilizadas, tanto do extrato quanto do óleo de *A. indica*, foram significativamente superiores ao incrementar a atividade da SOD nos quiabeiros tratados, quando comparados aos quiabeiros pulverizados apenas com água (concentração zero). Em plantas tratadas com o extrato hidroalcoólico, somente a concentração 0,25% não foi estatisticamente superior ao ASM e em plantas tratadas com o óleo de nim, comportamento semelhante foi observado nas concentrações de 0,25% e 0,50%. Para o extrato e para o óleo de nim, aumentos progressivos da concentração dos produtos induziram incrementos, também progressivos, da atividade da SOD (Figura 6).

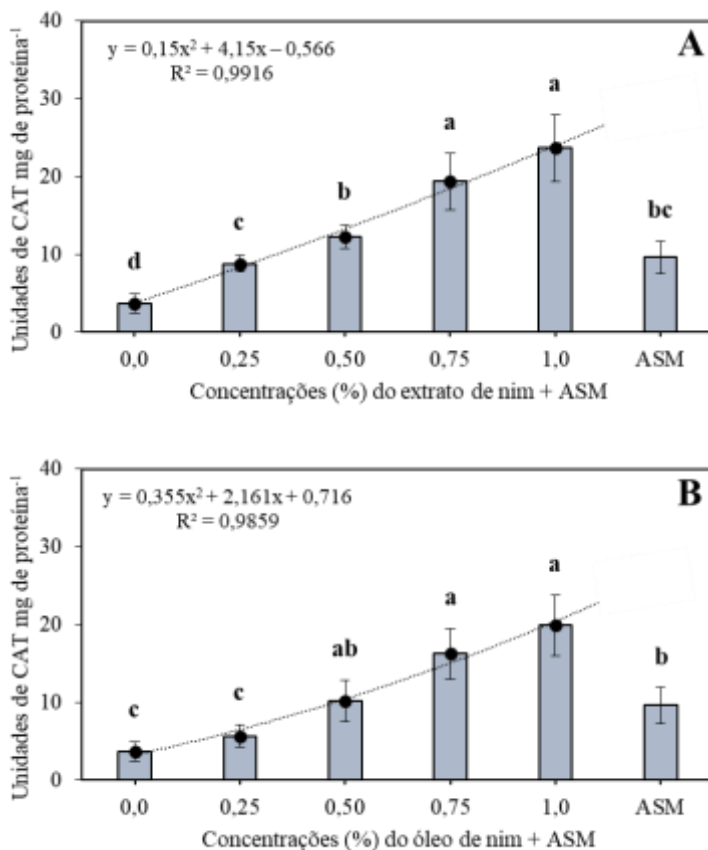
Figura 6. Atividade da enzima superóxido-dismutase (SOD), expressa em unidades de SOD mg de proteína⁻¹, em quiabeiros tratados com diferentes concentrações do extrato (A) e do óleo (B) de nim e posteriormente inoculados com o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. As letras minúsculas iguais sobre as colunas, dentro de um mesmo gráfico, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média



Fonte: Dados da pesquisa.

Incrementos na atividade da CAT foram observados tanto em plantas tratadas com o extrato quanto com o óleo de nim. Para o extrato, todos os tratamentos diferiram significativamente do controle negativo, nos quais se observou maior atividade enzimática que o referido controle. Ainda, nos tratamentos com o extrato, é importante destacar a atividade da CAT observada em plantas tratadas com as concentrações 0,75% e 1,0% do produto, que foram, significativamente, superiores ao controle promovido pelo ASM (Figura 7A). Em relação ao óleo, apenas a concentração 0,25% do produto não diferiu, estatisticamente, do controle negativo no incremento da atividade enzimática da catalase, sendo ainda, inferior ao conteúdo da enzima observado em plantas tratadas com o ASM. As concentrações de 0,75% e 1,0% do óleo, aplicadas aos quiabeiros, aumentaram de modo significativo a atividade da enzima, sendo maiores, inclusive, que os incrementos promovidos pelo ASM (Figura 7B).

Figura 7. Atividade da enzima catalase (CAT), expressa em unidades de CAT mg de proteína⁻¹, em quiabeiros tratados com diferentes concentrações do extrato (A) e do óleo (B) de nim e posteriormente inoculados com o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. As letras minúsculas iguais sobre as colunas, dentro de um mesmo gráfico, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média.



Fonte: Dados da pesquisa.

4. Discussão

Plantas de nim e seus constituintes moleculares são importantes sinalizadores celulares, em diferentes caminhos, a nível celular. Nesse contexto, existem várias moléculas que podem ser mais ou menos reguladas pela interação da célula com a planta de nim ou produtos do seu metabolismo. As moléculas que mais sofrem interferência, gerada a partir do tratamento com *A. indica*, segundo Gupta et al. (2017), incluem fatores de transcrição de moléculas, enzimas, fatores de crescimento, citocinas, quinases, receptores e proteínas envolvidas com a sobrevivência celular. Além destas, processos como a apoptose, as respostas de hipersensibilidade e a metástase de células também são interferidos (Hao et al., 2014; Patel et al., 2016).

Muitos trabalhos já foram publicados nos últimos anos, atestando o potencial do nim em controlar fitopatógenos (Imtiaj et al., 2005; Tumen et al., 2013; El-Ghany et al., 2015). Já desde 1995, foi demonstrado que o óleo de nim, utilizado em uma concentração que variou entre 2 e 10% controlou, em condições de campo, os fitopatógenos *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger* e *F. oxysporum* (Locke, 1995). Mais recentemente, a utilização de torta de nim, material oriundo do processamento das sementes da planta para a obtenção de óleo, inibiu o crescimento micelial dos fungos *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Colletotrichum* spp. e *Phytophthora capsici* (Duong et al., 2015). Ainda, Miya e Shamsi (2017) demonstraram que o extrato aquoso de *A. indica*, incorporado ao meio de cultivo BDA nas concentrações de 15% e 20%, inibiram completamente o crescimento micelial e esporulação dos fungos *Curvularia brachyspora*, *Fusarium* sp. e *Rhizopus stolonifer*. A inibição completa do crescimento e esporulação do fungo *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* não foi observada neste

trabalho, provavelmente, pelas baixas concentrações do extrato e óleo de nim utilizadas, sendo que estas não ultrapassaram a marca de 1,0%, valor duas a vinte vezes menor que as concentrações utilizadas pelos outros autores, concentrações estas, geradoras de fitotoxidez em plantas (Locke, 1995).

Mais de quarenta fitomoléculas, com atividade biológica, foram recentemente purificadas e caracterizadas a partir de plantas de nim (Gupta et al., 2017), e algumas delas são comprovadamente indutoras de resistência em plantas (Paul & Sharma, 2002; Itako et al., 2009; Matiello et al., 2016; Doshi et al., 2020).

A indução de resistência é um mecanismo de defesa vegetal induzido após estímulo gerado por um agente biótico ou abiótico, em que a planta responde produzindo barreiras estruturais e/ou bioquímicas no momento da infecção por um patógeno, barreiras essas que impedem ou retardam o estabelecimento das relações parasitárias estáveis. Em relação às respostas bioquímicas, em plantas tratadas com o nim, já foram descritas a indução da produção de fitoalexinas (Melo et al., 2017), algumas proteínas relacionadas com a patogênese (Goel et al., 2016) e o fenômeno da explosão oxidativa, medido indiretamente pela atividade de enzimas antioxidantes (Lorencetti et al., 2015; Sengupta et al., 2017).

Nos resultados apresentados neste trabalho, foram verificadas alterações significativas das enzimas antioxidantes guaiacol-peroxidase (POX), polifenoloxidasas (PFO), superóxido-dismutase (SOD) e catalase (CAT), induzidas pelo processo de infecção. Entretanto, o acúmulo maior dessas moléculas ocorreu nas plantas tratadas tanto pelo extrato quanto pelo óleo de nim, quando comparadas aos controles. Tais enzimas são responsáveis pela regulação das Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), sendo essas últimas moléculas transitórias e altamente reativas, produzidas no caminho metabólico de transformação do oxigênio molecular (O_2) em água (H_2O) (Baker & Orlandi, 1995). As EROs podem se acumular rapidamente no início do processo infeccioso em ambas as interações entre os quiabeiros e o fungo *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, ou seja, podem se acumular em interações compatíveis ou incompatíveis, culminando em um processo conhecido como explosão oxidativa (Lamb et al., 1989).

Aumentos da atividade da enzima POX, induzidas por extratos e óleos de nim, já foram registrados em plantas de cevada em interações com o patógeno *Drechslera graminea* (Paul & Sharma, 2002), em plantas de arroz nas interações com os patógenos *Rhizoctonia solani* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Kagale et al., 2004) e em tomateiros, em infecções compatíveis com raças do fungo *F. oxysporum* (Hanaa et al., 2011).

Há relatos de acúmulos das enzimas PFO e CAT em plantas de arroz e tomateiros tratados com extratos de nim, em interações com as bactérias *Xanthomonas oryzae* e *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, respectivamente (Nisha et al., 2012; Goel & Paul, 2015). O acúmulo das enzimas SOD, responsável pela dismutação ou oxidorredução do radical superóxido (O_2^-) em O_2 e H_2O_2 , e CAT, em tomateiros tratados com extrato preparado a partir de folhas de nim, foi inversamente proporcional à severidade da alternariose nessas plantas, ou seja, quanto maior a atividade das enzimas, menor foi a severidade da doença nas folhas tratadas (Dheebea et al., 2015).

Diante do exposto, a indução de resistência a partir de extratos, óleos e outras preparações oriundas de plantas do nim, expressa pela ativação de genes específicos e moduladores da atividade de enzimas antioxidantes, traduz-se em alternativa viável e real de manejo de doenças importantes. A habilidade da planta em eliciar certas reações bioquímicas na célula hospedeira leva à ativação de rotas metabólicas importantes no interior do vegetal, o que acaba se configurando em oportunidade de utilização e exploração. Além disso, a indução dos mecanismos de resistência das plantas, mediados por biomoléculas ativas e naturais, implicam em reduções significativas dos agrotóxicos sintéticos, os quais têm efeitos prejudiciais sobre os agroecossistemas, produtores expostos aos efeitos adversos da manipulação desses produtos químicos e consumidores.

5. Conclusão

O extrato e o óleo de nim, nas condições em que estes ensaios foram executados, têm efeitos diretos sobre o desenvolvimento do fungo *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, inibindo o crescimento micelial e a esporulação do patógeno, além da germinação e adesão de macro e microconídios produzidos pelo fungo. Além disso, os produtos, em todas as concentrações utilizadas, reduzem a capacidade de infecção do patógeno, o que culmina, diretamente, na diminuição da severidade da doença.

Finalmente, pelos resultados observados a partir da avaliação das enzimas antioxidantes, é possível que a resistência induzida em quiabeiros perpassa, também, pela explosão oxidativa e conseqüente regulação das espécies reativas de oxigênio (EROs) pelas enzimas POX, PFO, SOD e CAT. Os resultados obtidos nos ensaios aqui apresentados são inéditos no contexto do manejo alternativo da Fusariose em quiabeiros. Ensaios futuros, que mensurem a expressão dos genes de resistência da planta, durante o processo de indução de resistência, bem como a durabilidade do fenômeno, complementarão as respostas aqui apresentadas e poderão compor, de forma mais acertada, a estrutura do processo de indução de resistência nessas plantas.

Agradecimentos

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) e à Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), pelo apoio financeiro oferecido a esta pesquisa.

Referências

- Akhila, A., & Rani, K. (1999). Chemistry of the neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss.). *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe/Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, 47-149.
- Asada, K., Takahashi, M. A., & Nagate, M. (1974). Assay and inhibitors of spinach superoxide dismutase. *Agricultural and biological chemistry*, 38(2), 471-473.
- Baker, C. J., & Orlandi, E. W. (1995). Active oxygen in plant pathogenesis. *Annual review of phytopathology*, 33(1), 299-321.
- Bedendo, I. P. (2011). Murchas vasculares. In: Amorim L., Rezende J. A. M., Bergamin Filho A. (Eds.) *Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos*. São Paulo: Ceres.
- Beers, R. F., & Sizer, I. W. (1952). A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol chem*, 195(1), 133-140.
- Beltrame, A. B. (2010). *Interação Phytophthora nicotianae-porta-enxerto de citros (tangerina Sunki e citrumelo Swingle): efeito no sistema radicular, aspectos fisiológicos e bioquímicos* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- Bhuvanewari, V., Srivastava, A. K., & Paul, P. K. (2012). Aqueous fruit extracts of *Azadirachta indica* induce systemic acquired resistance in barley against *Drechslera graminea*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 45(8), 898-908.
- Biswas K, Chattopadhyay I, Banerjee RK, Bandyopadhyay U (2002) Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). *Current Science* 82(11):1336-1345.
- Brahmachari G (2004) Neem – an omnipotent plant: a retrospection. *Chembiochem* 5(4):408-421.
- Carvalho, J. R., Setubal, J. W., de Sousa, R. L., Mota, P. R. D. A., Alves, T. N., da Silva, V. B., & de Assis, H. J. C. (2020). Cultivares de quiabeiro sob diferentes polinizações e seus efeitos na qualidade física e fisiológica das sementes. *Brazilian Journal of Development*, 6(12), 94728-94738.
- Cia E., Grid-Papp, L. L., Soave, J., Ferraz, C. A. M. (1977). Resistência de Novos Cultivares de Algodoeiro a *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e a *Xanthomonas malvaceum*. *Summa Phytopathologica*, 3, 260-270.
- Cilo, B. D., Al-Hatmi, A. M., Seyedmousavi, S., Rijs, A. J., Verweij, P. E., Ener, B., & van Diepeningen, A. D. (2015). Emergence of fusarioses in a university hospital in Turkey during a 20-year period. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 34(8), 1683-1691.
- Dean, R., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., & Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 13(4), 414-430.
- Dheeba, B., Niranjana, R., Sampathkumar, P., Kannan, K., & Kannan, M. (2015). Efficacy of neem (*Azadirachta indica*) and tulsi (*Ocimum sanctum*) leaf extracts against early blight of tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 85(1), 327-336.
- Doshi, P., Nisha, N., Yousif, A. I. A., Körösi, K., Bán, R., & Turóczy, G. (2020). Preliminary Investigation of Effect of Neem-Derived Pesticides on *Plasmopara halstedii* Pathotype 704 in Sunflower under In Vitro and In Vivo Conditions. *Plants*, 9(4), 535.

- Duangmal, K., & Apenten, R. K. O. (1999). A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). *Food Chemistry*, 64(3), 351-359.
- Duong, D. H., Ngo, X. Q., Do, D. G., Le, T. A. H., Nguyen, V. T., & Nic, S. (2015). Effective control of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) cake to plant parasitic nematodes and fungi in black pepper diseases in vitro. *Journal of Vietnamese Environment*, 6(3), 233-238.
- El-Ghany, A., Roushdy, M. M., & Mohamed, A. A. (2015). Efficacy of certain plant extracts as safe fungicides against phytopathogenic and mycotoxigenic fungi. *Agric. Biol. Sci. J*, 1(3), 71-75.
- FILGUEIRA, F. (2008). *Novo Manual de Olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças*, (3a ed.), Viçosa: UFV.
- Goel, N., Anukrati, K., & Paul, P. K. (2016). Anti-phytopathogenic and SAR inducing properties of neem: A review. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*, 9(4), 2547-2555.
- Guleria, S., & Kumar, A. (2006). *Azadirachta indica* leaf extract induces resistance in sesame against *Alternaria* leaf spot disease. *Journal of Cell and Molecular Biology*, 5(2), 81-86.
- Gupta, A. S., Webb, R. P., Holaday, A. S., & Allen, R. D. (1993). Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress (induction of ascorbate peroxidase in superoxide dismutase-overexpressing plants). *Plant Physiology*, 103(4), 1067-1073.
- Gupta, S. C., Prasad, S., Tyagi, A. K., Kunnumakkara, A. B., & Aggarwal, B. B. (2017). Neem (*Azadirachta indica*): An indian traditional panacea with modern molecular basis. *Phytotherapy*, 34, 14-20.
- Hanaa, R. F., Abdou, Z. A., Salama, D. A., Ibrahim, M. A., & Srour, H. A. M. (2011). Effect of neem and willow aqueous extracts on *Fusarium* wilt disease in tomato seedlings: Induction of antioxidant defensive enzymes. *Annals of Agricultural Sciences*, 56(1), 1-7.
- Hao, F., Kumar, S., Yadav, N., & Chandra, D. (2014). Neem components as potential agents for cancer prevention and treatment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1846(1), 247-257.
- Hof, H. (2020). The Medical Relevance of *Fusarium* spp. *Journal of Fungi*, 6(3), 117.
- Imtiaj, A., Rahman, S. A., Alam, S., Parvin, R., Farhana, K. M., Kim, S. B., & Lee, T. S. (2005). Effect of fungicides and plant extracts on the conidial germination of *Colletotrichum gloeosporioides* causing mango anthracnose. *Mycobiology*, 33(4), 200-205.
- Itako, A. T., Schwan-Estrada, K. R. F., Stangarlin, J. R., Tolentino Júnior, J. B., & Cruz, M. E. S. (2009). Controle de *Cladosporium fulvum* em tomateiro por extratos de plantas medicinais. *Arquivos do Instituto Biológico*, 76(1), 75-83.
- James, S. P., Lond, M. B. (1903) The basil and the neem. *British Medical Journal*, 667.
- Kagale, S., Marimuthu, T., Thayumanavan, B., Nandakumar, R., & Samiyappan, R. (2004). Antimicrobial activity and induction of systemic resistance in rice by leaf extract of *Datura metel* against *Rhizoctonia solani* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 65(2), 91-100.
- Kamali, N., Pourjam, E., & Sahebani, N. (2015). Elicitation of defense responses in tomato against *Meloidogyne javanica* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* wilt complex. *Journal of Crop Protection*, 4(1), 29-38.
- Lamb, C. J., Lawton, M. A., Dron, M., & Dixon, R. A. (1989). Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. *Cell*, 56(2), 215-224.
- Locke, J. E. (1995). Fungi. In: Schmutterer, H. (Ed.) *The Neem Tree, source of Unique National Products for Integrated pest Management, Medicine, Industry and Other proposes*. Germany: VCH Weinheim.
- Lorencetti, G. A. T., Mazaro, S. M., Potrich, M., Lozano, E. R., Barbosa, L. R., Luckmann, D., & Dallacort, S. (2015). Alternative Products for *Thaumastocoris peregrinus* Control and Resistance Induction in Plants. *Floresta e Ambiente*, 22(4), 541-548.
- Matiello, J., Raasch-Fernandes, L. D., Berber, G. D. C. M., Trento, R. A., & Bonaldo, S. M. (2016). Síntese de Fitoalexinas em Soja e Sorgo por Extratos e Tinturas Pertencentes a Três Espécies Florestais. *Revista em Agronegócio e Meio Ambiente*, 9(3), 617-633.
- McKinney, H. H., & Davis, R. J. (1925). Influence of soil temperature and moisture on infection of young wheat plants by *Ophiobolus graminis*. *Journal of Agricultural Research*, 31(9), 827-840.
- Melo, T. A. D. (2017). *Efeito do extrato da alga marinha Ascophyllum nodosum e do fosfito de potássio na morfofisiologia do fungo Colletotrichum gloeosporioides, na indução de resistência em mangas "Tommy Atkins" contra a antracnose e em características físicas e químicas desses frutos* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- Melo, T. A., Araújo, M. U. P., Serra, I. M. R. D. S., & Pascholati, S. F. (2017). Commercially available natural products induce phytoalexin accumulation in soybean cotyledons and sorghum mesocotyls. *Summa Phytopathologica*, 43(3), 205-211.
- Menezes, M., & Assis, S. M. P. (2004). *Guia prático para fungos fitopatogênicos*. 2ª edição, Recife: UFRPE Imprensa Universitária.
- Mielniczuk, E., & Skwaryło-Bednarz, B. (2020). *Fusarium* Head Blight, mycotoxins and strategies for their reduction. *Agronomy*, 10(4), 509.
- Miya, M. D., & Shamsi, S. (2017). In Vitro Evaluation of Selected Plant extracts and Chemicals against Pathogenic Fungi isolated from *Momordica Charantia* L. *Journal of Bangladesh Academy of Sciences*, 41(1), 11-16.
- Mota, W. F., Oliveira, G. B., Nobre, S. A., & Silva, H. R. (2017). Agronomic performance of okra under the effect of seed microbiolization with rhizobacteria. *Horticultura Brasileira*, 35(3), 410-414.

- Moura, A. P., & Guimaraes, J. (2014). Manejo de pragas na cultura do quiabeiro. *Embrapa Hortaliças-Circular Técnica (INFOTECA-E)*.
- Nisha, S., Revathi, K., Chandrasekaran, R., Kirubakaran, S. A., Sathish-Narayanan, S., Stout, M. J., & Senthil-Nathan, S. (2012). Effect of plant compounds on induced activities of defense-related enzymes and pathogenesis related protein in bacterial blight disease susceptible rice plant. *Physiological and molecular plant pathology*, 80, 1-9.
- Patel, S. M., Venkata, K. C. N., Bhattacharyya, P., Sethi, G., & Bishayee, A. (2016, October). Potential of neem (*Azadirachta indica* L.) for prevention and treatment of oncologic diseases. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 40, pp. 100-115). Academic Press.
- Paul, P. K., & Sharma, P. D. (2002). *Azadirachta indica* leaf extract induces resistance in barley against leaf stripe disease. *Physiological and molecular plant pathology*, 61(1), 3-13.
- Santos, R., Pires, T. P., Mesquita, M. L. R., Correa, M. J. P., & Silva, M. R. M. (2020). Weed interference in okra crop in the organic system during the dry season. *Planta Daninha*, 38.
- Roncatto, M. C., & Pascholati, S. F. (1998). Changes in activity and electrophoretic pattern of peroxidase in maize (*Zea mays*) and sorghum (*Sorghum bicolor*) leaves treated with yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Scientia Agricola*, 55, 395-402.
- Sampaio, A. M., Araújo, S. D. S., Rubiales, D., & Vaz Patto, M. C. (2020). Fusarium wilt management in legume crops. *Agronomy*, 10(8), 1073.
- Schiwek, S., Beule, L., Vinas, M., Pfordt, A., von Tiedemann, A., & Karlovsky, P. (2020). High-Resolution Melting (HRM) Curve Assay for the Identification of Eight Fusarium Species Causing Ear Rot in Maize. *Pathogens*, 9(4), 270.
- Sengupta, P., Raman, S., Chowdhury, R., Lohitesh, K., Saini, H., Mukherjee, S., & Paul, A. (2017). Evaluation of apoptosis and autophagy inducing potential of *Berberis aristata*, *Azadirachta indica*, and their synergistic combinations in parental and resistant human osteosarcoma cells. *Frontiers in oncology*, 7, 296.
- Siah, A., Magnin-Robert, M., Randoux, B., Choma, C., Rivière, C., Halama, P., & Reignault, P. (2018). Natural agents inducing plant resistance against pests and diseases. In *Natural antimicrobial agents* (pp. 121-159). Springer, Cham.
- Siddiqui, S., Mahmood, T., Siddiqui, B. S., & Faizi, S. (1986). Two new tetranortriterpenoids from *Azadirachta indica*. *Journal of Natural Products*, 49(6), 1068-1073.
- Subapriya, R., & Nagini, S. (2005). Medicinal properties of neem leaves: a review. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*, 5(2), 149-156.
- Tahir, H. A., Gu, Q., Wu, H., Raza, W., Hanif, A., Wu, L., & Gao, X. (2017). Plant growth promotion by volatile organic compounds produced by *Bacillus subtilis* SYST2. *Frontiers in Microbiology*, 8, 171.
- Terra, W. C., Campos, V. P., Pedrosa, M. P., da Costa, A. L., Freire, E. S., de Pinto, I. P., ... & Santos, T. C. N. (2017). Volatile molecules of *Fusarium oxysporum* strain 21 are retained in water and control *Meloidogyne incognita*. *Biological Control*, 112, 34-40.
- Toledo, G. L., & Ovalle, I. I. (2008). *Estatística Básica*. Atlas.
- Tumen, I., Eller, F. J., Clausen, C. A., & Teel, J. A. (2013). Antifungal activity of heartwood extracts from three *Juniperus* species. *BioResources*, 8(1), 12-20.
- van Diepeningen, A. D., & de Hoog, G. S. (2016). Challenges in *Fusarium*, a trans-kingdom pathogen. *Mycopathologia*, 181(3-4), 161-163.
- Wang, J., Li, J., Cao, J., & Jiang, W. (2010). Antifungal activities of neem (*Azadirachta indica*) seed kernel extracts on postharvest diseases in fruits. *African Journal of Microbiology Research*, 4(11), 1100-1104.