



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM PROTEÇÃO DE PLANTAS



VALDEIR NUNES CARVALHO

Controle alternativo da pinta preta do inhame (*Dioscorea* sp.)

RIO LARGO

2019

VALDEIR NUNES CARVALHO

Controle alternativo da pinta preta do inhame (*Dioscorea* sp.)

Defesa de dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Proteção de Plantas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Edna Peixoto da Rocha Amorim

RIO LARGO

2019

VALDEIR NUNES CARVALHO

Controle alternativo da pinta preta do inhame (*Dioscorea* sp.)

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas da Universidade Federal de Alagoas.

Prof.^a Dr.^a Edna Peixoto da Rocha Amorim
(Orientadora)

Banca examinadora:

Prof. Dr. Nelson Augusto Nascimento Junior.
(Examinador Externo)

Prof.^a Dr. Iraildes Pereira Assunção
(Examinador interno)

Querido Deus

“Deus, me dê força e coragem e me aperfeiçoe,
pois quero transformar este mundo num mundo perfeito.”

Malala

Deus entrego a ti todo o meu ser, todas as conquistas desse trabalho só por ti e para ti.

Também dedico aos meus familiares que são os meus portos seguros para tudo na minha vida.

Dedico a minha mãe e meus irmãos que estiveram sempre ao meu lado.

E especialmente e eternamente em meu coração meu pai José que foi e sempre será fonte de inspiração do meu ser.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

“Meu Pai, meu Pai do céu
Meu Pai do céu eu quase me esqueci, me esqueci
Que o teu amor vela por mim, vela por mim
Que seja feito assim”

E é assim sempre, meu Senhor, a quem agradeço imensamente de meu coração, onde tu habitas e ajuda a teu filho a caminhar em frente, sempre de teu amor para o mundo. “A Ele a Glória, a Ele o louvor, a Ele o domínio. Ele é o Senhor”,

Ao Centro de Ciências Agrárias que se não é a melhor instituição está no caminho certo para ser, por todos aqueles que trabalham que ajudam nesse belíssimo centro de formação profissional e porque não pessoal, eu agradeço imensamente.

A minha grandiosa orientadora Comendadora Prof.^a Dr.^a. Edna Peixoto da Rocha Amorim que acima de tudo, tornou-se amiga e verdadeira inspiração para aqueles que conhecem e a rodeiam. Por todos os momentos de motivação, de ajuda, de singela orientação, paciência, ensinamentos, sendo a maior referência, espelho que um profissional poderia ter. Obrigado minha mãe científica como sempre designo a sua excelência por ter a honra de ter sido seu contemporâneo nessa vida.

Em meus bons momentos, em meus momentos não tão bons felizmente tive e tenho a melhor família, que certamente tudo só foi possível por eles. Agradeço em especial aos meus pais e irmãos. Meu Pai José Teles Carvalho que foi e é a minha fonte inspiradora mesmo não estando fisicamente entre nós, no fundo do meu coração ele está me conduzindo sempre; a minha Mamãe Josefa Nunes Carvalho, que em todos os momentos de derrotas e glórias nunca deixou de estar ao meu lado me apoiando e vibrando com minhas conquistas. Aos meus irmãos José Teles Carvalho Jr., Valmir Nunes Carvalho e Valdemir Nunes Carvalho e a minha cunhada Ana Maria cada um com seu jeito particular sempre me ajudando e trazendo forças para poder seguir em frente nessa caminhada.

Em especial quero agradecer a técnica do laboratório de fisiologia vegetal e amigos que fiz por lá que foram pessoas incríveis e essenciais para desenvolver meu trabalho, muito obrigado e realmente tenho dívidas com vocês. Os colegas desse mesmo laboratório que, independente de quem e de onde eu era, me fez sentir parte nos momentos que estive a desenvolver os experimentos, muito obrigado.

Não poderia deixar de fora todos os meus amigos que me ajudaram nessa batalha que estiveram comigo e sempre me apoiaram. Em especial agradeço ao meu irmão Samuel Silva de Lima que a vida me deu e que seja para todo sempre. Muito obrigado.

Aos grandes amigos que fiz nessa pós-graduação, em especial David Jossue (Chicharito) como ficou assim conhecido, um presente de Deus como amigo sempre ajudando e estando a disposição muito obrigado, a Karen Oliveira de Menezes menina, mulher de respeito que é guerreira certamente me ajudou muito, a Glauber Santos Pereira meu grande parceiro de viagem juntos realizamos um sonho, Alison Van Der Linden de Almeida eternamente meu amigo, a Samário Lino dos Santos melhor profissional e amigo. Ao meu parceiro chefe Erasmo Ribeiro da Paz Filho que foi mesmo nas horas complicadas até pra roçar mato esteve junto, forte abraço e muito obrigado.

A minha namorada Vanessa Fernandes Soares mais do que uma mulher em minha vida, um presente e prova de amor ao qual quero crescer junto. Com toda a licença da eterna Flor Bela Espanca “Não és sequer a razão de meu viver, pois que tu és já toda a minha vida”. Muito obrigado por tudo.

Agradeço também aos professores do CECA que foram essenciais para essa formação, meus mestres fica meus agradecimentos sinceros. Em Especial quero mencionar o Diretor da instituição Prof. Dr. Gaus Silvestre Andrade Lima e a coordenadora do curso de Proteção de Plantas Prof. Dr. Iraíldes Pereira Assunção, sempre estiveram à disposição a ajudar e ter paciência com meus pedidos.

A Prof. Dr. Maria de Fátima Muniz pela belíssima amizade e ajuda a quem pude recorrer nas vezes que a minha orientadora esteve incapacitada, eterno obrigado.

Por fim ao CNPq e a CAPES que proporcionaram o desenvolvimento desse projeto financiando, confiando no andamento das pesquisas e no meu trabalho, meus sinceros muito obrigado.

RESUMO

Carvalho, Valdeir Nunes. Controle alternativo da pinta preta do inhame (*Dioscorea* spp.). Rio Largo: UFAL – CECA, 2019. 52p. (Dissertação, curso de Pós-graduação em proteção de plantas)

A pinta preta do inhame (*Curvularia eragrostidis* (Henn.) Meyer) causa transtornos econômicos aos produtores da cultura do inhame (*Dioscorea* spp.). A implementação de uma alternativa de controle pode contribuir para a solução do problema. Este trabalho objetivou avaliar a capacidade dos produtos naturais e indutores de resistência no controle da doença. Foram realizados bioensaios em casa de vegetação (preventivo e curativo), avaliando-se a aplicação dos produtos sobre as folhas de plantas de inhame: óleo de hortelã (100µL); extrato de alho (20%), extrato de folhas de inhame (20%); *Trichoderma* sp. (2,0 g L⁻¹); ASM (0,15 g L⁻¹ e 0,3 g L⁻¹); Ecolife® (2%); Fungicida mancozeb (1,7 g L⁻¹) e água (testemunha), 48h e 72h antes e após a inoculação do patógeno (1,7 x 10⁶ con.mL⁻¹). Quinze dias após avaliou-se a severidade da doença com a escala diagramática proposta por Michereff et al (2000). Foram realizados dois experimentos de campo. No primeiro, foram preparados canteiros contendo substrato de plantio Bioplant, seguida do plantio de rizóforos de inhame cv. Da Costa. Dois e quatro dias após o aparecimento de sintomas da doença (infecção natural), as plantas foram pulverizadas com 10mL dos tratamentos, selecionados no experimento anterior: óleo de hortelã (100µL), extrato vegetal de alho (20% v/v), extrato de folhas de inhame (20% v/v), fungo *Trichoderma* sp. (2,0g L⁻¹), fungicida mancozeb (1,7g L⁻¹), ASM (0,3g L⁻¹) e ADE (testemunha). O espalhante adesivo Tween 20 (1mL) foi adicionado a todos os tratamentos. A severidade da doença foi avaliada quinze dias após os tratamentos. No segundo, foi realizado o plantio dos rizóforos de inhame cv. Da Costa, seguindo as mesmas condições do ensaio anterior. Os tratamentos utilizados foram oriundos das melhores avaliações dos experimentos anteriores: o fungo *Trichoderma* sp (2,0 g L⁻¹); extrato de alho (20% v/v) ; ASM (0,3g L⁻¹); o fungicida Mancozeb (1,7 g L⁻¹), nos tempos de 48h e 72h após o aparecimento dos sintomas. A testemunha foi tratada apenas com ADE. O espalhante adesivo Tween 20 (1mL) foi adicionado a todos tratamentos. As Avaliações foram realizadas as quinze dias e 30 dias após o aparecimento dos sintomas. Posteriormente, mudas de inhame com 45 dias de idade receberam tratamento com *Trichoderma* sp. (48h e 72h); Óleo de hortelã e óleo de cravo. As plantas foram inoculadas com suspensão de inóculo do patógeno 24 horas após tratadas, e a quantificação da atividade das enzimas Peroxidases (POX) e Fenilalanina Amonia-Liase (FAL), relacionadas com as respostas de defesa vegetal, foram realizadas após 24, 48, 72 e 96 horas. Os dados obtidos foram submetidos à análise da variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Os resultados obtidos mostraram que tratamentos com extrato da folha de inhame, o fungo *Trichoderma* sp., o óleo de hortelã e o fungicida mancozeb aplicados até 72h antes da inoculação do patógeno, reduziram a severidade da pinta preta do inhame. O fungicida mancozeb aplicados 48h e 72h, *Trichoderma* sp. e óleo de hortelã aplicados 48h após a inoculação do patógeno foram eficientes no controle da doença em condições de casa de vegetação, além de reduziram a severidade da doença em condições de campo. O fungo *Trichoderma* sp persistiu na área 30 dias após a sua aplicação e induziu a resistência de plantas de inhame, ativando as enzimas de Fenilalanina-amônia-liase (FAL) e Peroxidase de fenóis (POX). Pode-se concluir que o fungo *Trichoderma* sp (2,0g L⁻¹), aplicado de forma preventiva ou curativa é capaz de controlar a pinta preta do inhame.

Palavras chave: Extrato vegetal, óleo essencial, indutor de resistência, *Curvularia eragrostides*

ABSTRACT

Carvalho, Valdeir Nunes. Alternative control of black spot of yam (*Dioscorea* spp.). Rio Largo: UFAL – CECA, 2019. 52p. (thesis, course at post-graduation in plant protection)

The black spot of the yam (*Curvularia eragrostidis* (Henn.) Meyer) causes economic disturbances to the producers of the yam crop (*Dioscorea* spp.). The implementation of a control alternative can contribute to the solution of the problem. The objective of this work was to evaluate the ability of the natural products and inducers of resistance in the control of black spot yam. Bioassays were carried out in greenhouse (preventive and curative), to which the treatments were evaluated: mint oil (100 μ L); garlic extract (20%), yam extract (20%); *Trichoderma* sp. (2.0 g L⁻¹); ASM (0,15 g L⁻¹ and 0.3 g L⁻¹); Ecolife® (2%); mancozeb (1.7 g L⁻¹) and water (control), applied on the leaves of yam plants, 48h and 72h before and after inoculation of the pathogen (1,7 x 10⁶ con.mL⁻¹). Two field experiments were carry out. The first experiment prepared beds containing Bioplant planting substrate, followed by the planting of yams rhizophores cv. Da Costa. Two and four days after the onset of disease symptoms (natural infection), the plants were sprayed with 10mL of the treatments, selected in the previous experiment: mint oil (100 μ L), garlic leaf extracts (20%), yam leaf extracts (20%), *Trichoderma* sp. (2.0 g L⁻¹), ASM (0.3 g L⁻¹) and mancozeb (1.7 g L⁻¹). The Tween 20 patch (1mL) was added to all treatments. Disease severity was assessed fifteen days after the treatments. In the second, it was carried out the planting of the rhizophores of yam cv. Da Costa, following the same conditions of the previous test. The treatments used came from the best evaluations of previous experiments: the fungus *Trichoderma* sp. (2.0 g L⁻¹); garlic extract (20% v / v); ASM (0.3 g L⁻¹); the fungicide mancozeb (1.7 g L⁻¹), at 48 h and 72 h after symptom onset. The control was treated with ADE alone. Tween 20 (1mL) patch was added to all treatments. The evaluations were performed the fifteen days and 30 days after the onset of symptoms. Later, 45-day old yams were treated with *Trichoderma* sp. (48h and 72h); minty oil and clove oil. The plants were inoculated 24 hours after treatment, and the activity of the enzymes Peroxidases (POX) and Phenylalanine Ammonia-Liase (PAL) related to plant defense responses, were performed after 24, 48, 72 and 96 hours. The data were submitted to analysis of variance (ANOVA) and the means were compared by the Tukey test at the 5% probability level. The results showed that treatments with Yam leaf extract, *Trichoderma* sp. fungus, mint oil and mancozeb applied up to 72h prior to inoculation of the pathogen, reduced the severity of the black yarn spot. Mancozeb applied 48h and 72h, *Trichoderma* sp. and mint oil applied 48h after inoculation of the pathogen, were efficient in controlling the disease under greenhouse conditions and reduced the severity of the disease under field conditions. The fungus *Trichoderma* sp. persisted in the area 30 days after its application and induced the resistance of yam plants, activating Phenylalanine ammonia (FAL) and Peroxidase of phenols (POX). It can be concluded that the fungus *Trichoderma* sp. (2.0 g L⁻¹), applied preventively or curatively, is able to control the black dye of the yam.

Key words: Vegetable extract, essential oil, resistance inducer, acquired systemic resistance.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Considerações gerais sobre a cultura do inhame	13
2.2 Doenças do inhame.....	15
2.2.1 Pinta preta do inhame	16
2.3 Manejo da pinta preta do inhame	17
2.4 Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos.....	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Isolamento e teste de patogenicidade	24
3.2 Efeito preventivo de produtos naturais sobre o controle da pinta preta do inhame em casa de vegetação (<i>Curvularia eragrostidis</i>).....	24
3.3 Efeito curativo de produtos naturais no controle da pinta preta do inhame (<i>Curvularia eragrostidis</i>) em casa de vegetação	26
3.4 Avaliação de produtos naturais no controle da pinta preta de inhame (<i>Curvularia eragrostidis</i>) em Campo (município de Satuba/AL).....	26
3.5 Avaliação de produtos naturais no controle da pinta preta do inhame (<i>Curvularia eragrostidis</i>) em Campo (município de Limoeiro de Anadia)	27
3.6 Avaliação dos produtos alternativos sobre a atividade de enzimas relacionadas com indução de resistência em folhas de inhame	28
3.6.1 Obtenção do extrato proteico	28
3.6.2 Quantificação de proteínas	29
3.6.3 Determinação da atividade de FAL.....	29
3.6.4 Determinação da atividade POX	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	31
4.1 Identificação do isolado.....	31
4.2 Patogenicidade do isolado.....	31
4.3 Efeito preventivo de produtos naturais sobre a severidade da pinta preta do inhame em casa de vegetação	32
4.4 Avaliação do efeito curativo de produtos naturais no controle da pinta preta do inhame (<i>Curvularia eragrostidis</i>) em casa de vegetação	34
4.5 Avaliações do efeito de produtos naturais sobre a pinta preta do inhame em campo (Satuba- AL).....	36
4.6 Avaliações do efeito de produtos naturais sobre a pinta preta do inhame em campo (Limoeiro de Anadia – AL).....	37
4.7 Avaliação dos produtos alternativos sobre a atividade de enzimas relacionadas com indução de resistência em folhas de inhame	40
5 CONCLUSÕES	43
REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

O inhame (*Dioscorea* spp. L.), uma cultura de grande aceitação de mercado, constitui um dos principais alimentos em regiões tropicais. Apresenta grande importância socioeconômica para a região Nordeste do Brasil, sobretudo para os Estados da Paraíba, Pernambuco, Bahia, Maranhão e Alagoas, por ser um negócio agrícola promissor, dado a excelente qualidade nutritiva e energética de seus rizóforos para a alimentação humana. É utilizado em vários pratos desde os mais rústicos aos pratos gourmet. Seu consumo muitas vezes é associado a benefícios medicinais tais como a redução do colesterol LDL, ação desintoxicante e antioxidante, baixo teor calórico, além de ser fonte de cálcio, fósforo, ferro, sódio e potássio, ter baixo teor de gordura e conter todas as vitaminas do complexo B, entre outros aspectos (ASCOM, 2014).

A produção de inhame no nordeste brasileiro vem sofrendo alguns entraves para o aumento da produção, como problemas técnicos e fitossanitários, que dificultam a produtividade da cultura em comparação com outros locais produtores.

Dentre esses, pode-se destacar alguns cuidados com fitopatógenos, visto que, o inhame sofre o ataque de diferentes agentes etiológicos de relevante importância para a cultura. Diversas doenças já foram relatadas na cultura, dentre elas, destaca-se, a pinta preta do inhame causada por *Curvularia eragrostidis* (Henn.) Meyer [teleomorfo *Cochliobolus eragrostidis* (Tsuda & Ueyama) Sivan.], que pode ocorrer regularmente nas áreas de produção durante todo o ano (MICHEREFF, 2000), podendo atingir alta incidência e severidade, além de reduzir em torno de 35 a 40% o peso do rizóforo comercial (MOURA, 2005).

A utilização de medidas preventivas são escassas ou não existem, fazendo assim uso de fungicidas químicos que não possuem registro para a cultura como: produtos à base de mancozeb, triadimenol e tebuconazole (KIMATI, 2005), tornando essencial o desenvolvimento de técnicas alternativas de controle.

Métodos alternativos de controle com substâncias obtidas a partir de produtos naturais, tais como, biofungicidas, extratos vegetais e óleos essenciais já vêm sendo estudados há algum tempo com a finalidade de controlar fitopatógenos. A solução vem sendo bem vista, devido ao atual interesse mundial de utilizar produtos menos agressivos ao ambiente, promovendo assim, a sustentabilidade agrícola (SOUSA, 2012; SILVA; MELO, 2013). Segundo Stadnik; Talamini (2004) e Silva et al. (2009), os produtos naturais de plantas podem apresentar três atividades principais: antimicrobiana, com ação direta sobre o desenvolvimento do patógeno; bioestimulantes do crescimento da planta e indutores de resistência, ativando os mecanismos

de defesa da planta através de moléculas bioativas (SANTOS, 2015). Tais mecanismos podem envolver enzimas como peroxidase, β -1,3-glucanase, quitinase, fenilalanina amônia-liase e polifenoloxidase (PERREIRA, 2009).

Dessa maneira, considerando que o patógeno em questão apresenta problemas consideráveis a cultura do inhame, e que o uso de produtos naturais vem sendo estudado com êxito no controle de patógenos causadores de doenças de plantas, o objetivo do trabalho foi avaliar a capacidade dos produtos naturais no controle da pinta preta do inhame através da indução de resistência em plantas de inhame.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Considerações gerais sobre a cultura do inhame

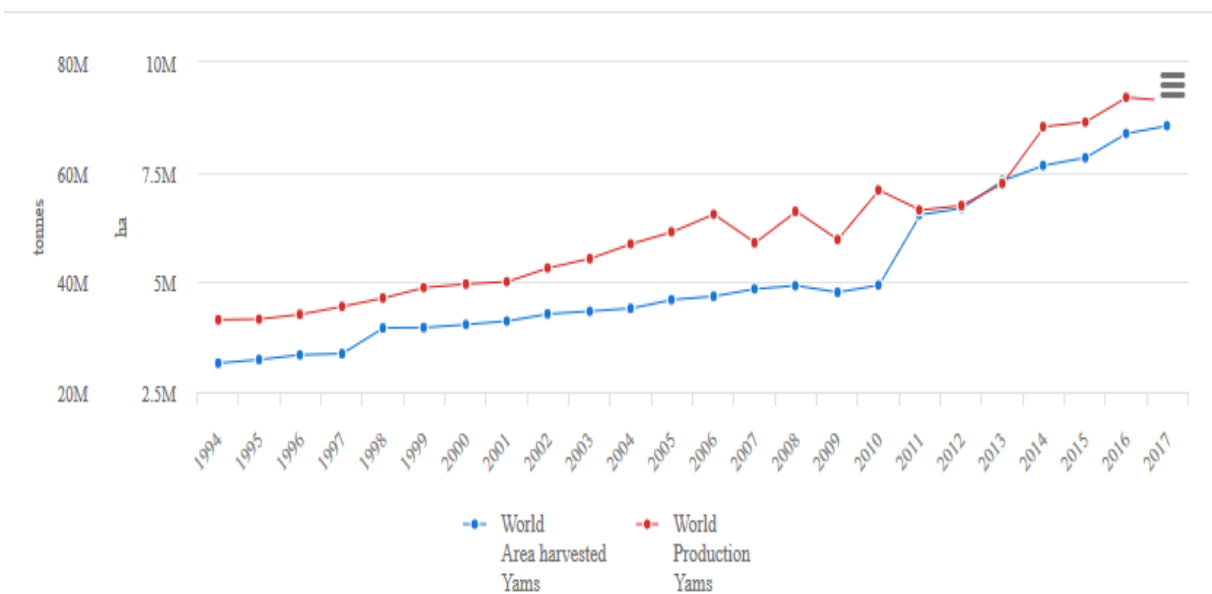
O inhame tem sua origem nas zonas tropicais da Ásia e no oeste africano e foi introduzido no Brasil pelos colonizadores (NETO, 2000), passando a ter muita importância nessas regiões. É um alimento saudável de primeira grandeza, ou seja, rico em diversos minerais, com muitas funções orgânicas e de muita utilidade para os povos que habitam as regiões tropicais e subtropicais (SANDES, 2014).

Trata-se de uma cultura de relevância no âmbito mundial, e sobretudo nos países africanos, tendo a Nigéria como a maior produtora em cerca de 45 milhões de toneladas. O Brasil é o segundo maior produtor do inhame na América Latina com produção anual de 250 mil toneladas (FAO, 2017) como podemos observar nos gráficos I e II. O nordeste brasileiro destaca-se na produção de rizóforo de inhame com aproximadamente 38,2 mil toneladas (SEPLANDE, 2012).

Gráfico 1 – Comparativo da área produzida de inhame e a produção mundial do período de 1994 a 2017.

Production/Yield quantities of Yams in World + (Total)

1994 - 2017

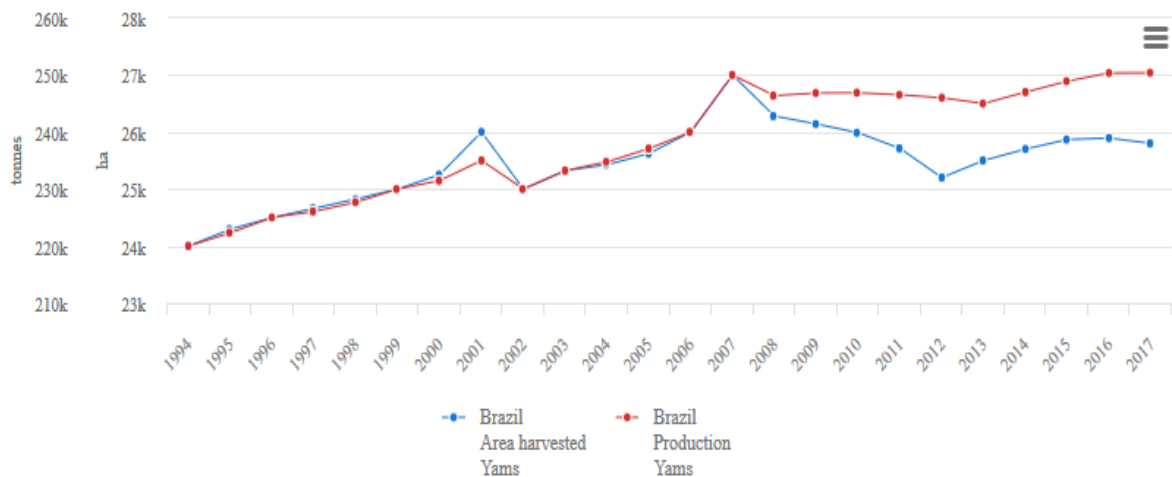


Fonte: FAO 2017.

Gráfico 2 - Comparativo da área produzida de inhame no Brasil e sua produção do período de 1994 a 2017.

Production/Yield quantities of Yams in Brazil

1994 - 2017



Fonte: FAO 2017.

No Brasil, as áreas de produção de inhame (*Dioscorea* spp.) são concentrados nos estados da região Nordeste, com 90% da produção nacional, sendo os Estados da Paraíba, Pernambuco, Bahia, Alagoas e Maranhão (SEPLANDE, 2012) os que possuem maiores taxas de produção no Nordeste. A maior parte desta produção de inhame é encaminhada para o comércio interno e a outra parte, a de melhor qualidade comercial, para exportação, sendo os Estados Unidos, Reino Unido, Países Baixos, Canadá e França os principais importadores (MESQUITA, 2002).

Em Alagoas, mais de 50% da área produtora de inhame está localizada no Vale do Paraíba, região que representa 8% do território alagoano, onde estão situados os municípios de Viçosa, Paulo Jacinto, Chã Preta, Quebrângulo, Pindoba, Atalaia e Mar Vermelho, correspondendo a uma área de 2.176 quilômetros quadrados de terras férteis. É uma das principais atividades econômicas da agricultura familiar da região. Esta região se destaca por suas condições edafoclimáticas propícias para o desenvolvimento da cultura: clima com precipitação em torno de 1.000 mm, solos mediantemente profundos, porosos, moderadamente drenados e boa fertilidade natural (NOBRE, 2012).

Sua principal importância em Alagoas são os aspectos sociais, apesar da expansão da cultura ser lenta em função das dificuldades que o manejo do inhame apresenta. Essa situação contrasta com o fato do inhame ser um produto de mercado interno e externo estável, tendo a

considerar a demanda e preço (SOUZA; CARMO, MELO, 2013). Quando se trata de exportação, é necessário ter um produto de qualidade, evitando assim o mau aspecto e tamanho dos rizóforos e perdas por deterioração biológica durante o armazenamento (SANTOS, 2002).

Sobre as características morfológicas da cultura, de acordo com Santos (2002), trata-se de uma raiz tuberosa, alongada, de cor castanho-claro; caule volúvel, com folhas opostas e por raras vezes folhas alternas. A propagação é feita através do material vegetativo, que pode ser por rizóforo-sementes ou rizóforos inteiros, sendo que o inhame para consumo geralmente pesa de 1 a 10 kg (NETO, 2000).

A cultura do inhame se desenvolve bem em clima tropical quente e úmido, com pluviosidade de 1.000 a 1.600 mm anuais, em temperaturas de 24 a 30 °C e umidade relativa do ar variando de 60 a 90%. Sua produção é satisfatória em solos com texturas arenosa e média, profundos e bem drenados, arejados e férteis, ricos em matéria orgânica, com pH de 5,5 a 6,5 (SANTOS, 1996).

O plantio pode ser feito em covas altas (matumbos) no tamanho de 0,40 x 0,40 m, com 0,30 m de altura; em camalhões (leirões) ou em sistemas de valas com profundidade de 45 m (NETO, 2000). Recomenda-se os espaçamentos de 1,20 x 0,60 m e 1,20 x 0,50 m para os plantios em leirões, e de 1,20 m x 0,80 m e 1,00 m x 0,80 m para os plantios manuais, em matumbos (SANTOS, 2002).

Durante o desenvolvimento vegetativo do inhame se faz o espaldeiramento, onde se utiliza uma vara com 2 m de comprimento por planta ou uma para cada duas plantas. Também pode-se fazer o espaldeiramento na forma de espaldeira, semelhante ao utilizado na cultura do tomate (AZEVEDO, 1997).

Na colheita do inhame podem ser realizadas duas vezes, dependendo da finalidade do cultivo. Quando pretende-se produzir rizóforos-semente através da técnica da capação, realiza-se uma colheita aos sete meses após o plantio, quando a finalidade não é para rizóforos-semente, geralmente é aos nove meses após o plantio ou quando ocorre a secagem dos ramos e folhas da planta (SANTOS, 2002).

2.2 Doenças do inhame

Várias doenças afetam a cultura do inhame, sendo as doenças fúngicas as que mais se destacam, uma vez que afetam tanto os rizóforos, causando podridões, tais como, podridão verde (*Penicilium sclerotigenum* Yamam), podridão aquosa (*Rhizopus oryzae* Went & Prins. Geerl e *Sclerotium rolfsii* Sacc.), quanto aquelas que se manifestam na parte aérea, conhecidas

por pinta preta (*Curvularia eraglostidis* (Henn, Meyer) e a antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. e Sacc.), além do mosaico do inhame, causado do Yam mosaic vírus-YMC e também as doenças causadas por nematóides como: Meloidoginoses (*Meloidogyne incognita* Kofoid & White, Chitwood, *M. javanica* (Treub) Chitwood e *M. arenaria* Neal, Chitwood), a casca preta ou podridão seca (*Scutellonema bradys* (Steiner & Lehew) Andrassy, *Pratylenchus coffeae* (Zimmermann) Filipjev & Schuurmans Stekhoven, *P.brachyurys* (Godfrey) Filipjev & Schuurmans Stekhoven).

2.2.1 Pinta preta do inhame

A pinta-preta do inhame, também conhecida por queima das folhas do inhame e varíola do inhame é uma doença de alta incidência e severidade em todas as áreas do nordeste brasileiro (MOURA,2005), chegando a provocar perdas de até 40% no peso dos rizóforos comerciais (MOURA, 2006).

Essa doença é causada pela espécie fúngica *C. eragrostidis*, que pertence ao Reino: Fungi, Filo: Ascomycota, Classe: Euascomycetes, Ordem: Pleosporales, Família: Pleosporaceae, Gênero: *Curvularia*. Seus conidióforos são escuros e simples, produzindo os conídios ovóides no ápice, apresentando de 3 a 5 células, onde as centrais são mais escuras e as das extremidades mais claras e hialinas, cujo teleomorfo é a espécie *Cochiobolus eragrostidis* (KIMATI, 2005).

As melhores condições ambientais para o desenvolvimento do patógeno se caracterizam por elevada umidade relativa do ar e chuvas frequentes, bem como temperaturas máxima e mínima em torno de 30°C e 21°C, respectivamente, que favorecem a ocorrência e a severidade da doença (SANTOS, 2007).

Os restos culturais e os rizóforos-semente infestadas constituem as principais fontes de inóculo primário de *C. eragrostidis* na cultura do inhame (KIMATI, 2005). Contudo, o inóculo também pode ser proveniente de outras plantas hospedeiras, uma vez que essa espécie causa doença em mais de 80 gêneros botânicos (ELLIS, 1966). A disseminação dos esporos de *C. eragrostidis* ocorre principalmente pelo vento.

Os principais sintomas da pinta-preta do inhame são manchas necróticas circulares, de coloração marrom-escura, com um halo amarelo. Tais manchas podem coalescer formando grandes áreas necrosadas. O sintoma secundário é observado pelo baixo peso (reduzindo de 30 a 40%) e pequeno tamanho dos rizóforos observados no final do ciclo de cultivo, diminuindo a produtividade (MOURA, 2005).

2.3 Manejo da pinta preta do inhame

O manejo principal da pinta-preta do inhame é a utilização de fungicidas, como mancozeb, triadimenol e tebuconazole. Esses produtos apesar de não possuir registro são largamente usados pelos produtores (MICHEREFF, 2000). Porém, recentemente o ministério de agricultura, pecuária e abastecimento sob o registro de número 02811 acrescentou o químico TENAZ, que possui como grupo químico os triazóis, para o manejo da doença na cultura (AGROFIT, 2017).

Essa utilização de produtos fitossanitários indiscriminadamente preocupa toda a comunidade em geral, sobretudo nas consequências provenientes desse uso, tais como: contaminação residual dos alimentos, dos animais, do solo, contaminação dos lençóis freáticos e fontes de água em geral.

Devido a esses problemas com os produtos químicos vem sendo usado métodos alternativos que não façam uso de produtos fitossanitários, como a utilização de extratos de plantas, e outros compostos naturais, podendo ser de preparação caseira ou adquiridos no comércio, a partir de substâncias não prejudiciais ao homem e ao meio ambiente (PENTEADO, 1999).

Inúmeros extratos aquosos e óleos essenciais de plantas vem sendo testados sobre microrganismos fitopatogênicos. Como exemplo de óleos essenciais de *Mentha piperita* L. e *Mentha arvensis* L., ao qual foi verificada atividade antimicrobiana contra as bactérias *Helicobacter pylori* e *Staphylococcus aureus*, tanto em linhagens sensíveis como resistentes a antibióticos. Muitos trabalhos vêm demonstrando o efeito fungicida e fungistático desse óleo sobre cerca de 23 espécies, entre elas: *Alternaria* sp., *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn, *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, *Mitteilungen*, *F. solani* Snyder e *Rhizoctonia bataticola* (Taub) Butle com resultados promissores em diversas culturas (SINGH, 1993). Podemos destacar também produtos naturais como: o Ecolife® e o extrato de alho, que se apresentam com atividade natural, com comprovada ação nematicida, inseticida e fungicida (FURTADO, 2006) ou como indutores de resistência.

O Ecolife®, um composto, obtido de biomassa cítrica, a base de bioflavonóides cítricos e fitoalexinas cítricas, já é largamente utilizado, pois além de melhorar a resistência das plantas ao “stress”, tem apresentado êxito como ativador de resistência a doenças causadas por bactérias e fungos (OLIVEIRA, 2014).

O extrato de alho (*Allium sativum* L.) fresco possui várias substâncias ativas, tendo como um dos princípios ativos a alicina, que é responsável pelo típico cheiro do alho. Inúmeras

pesquisas vêm sendo feitas com esse extrato e descobrindo ações antifúngicas e antibacterianas (SANTOS, 2010). A alicina é responsável por efeitos tóxicos que inativam os microrganismos e fazem a defesa da planta (HEINZMANN, 2001). No alho (*A. sativum*) existem cerca de 30.000 Terpenóides que são compostos químicos secundários, tendo assim a maior classe de ativos químicos de plantas (VERPOORTE, 2001).

Em estudos realizados por Silva (2007), o extrato de alho e óleo de citronela (*Cymbopogon nardus* L.) induziu a resistência em mudas de bananeira (*Musa* spp. L.), reduzindo a incidência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Smith) Snyder e Hansen.

Os óleos essenciais, que são compostos naturais, misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, com baixo peso molecular, caracterizada por possuírem um odor agradável e forte, produzidos por plantas aromáticas com metabólitos secundários, têm sido amplamente utilizado desde a Idade Média para fins bactericidas, fungicidas, antiparasitários, inseticidas, aplicações medicinais e cosméticos (MORAES, 2009). Originários do metabolismo das plantas possuem uma complexa composição química e são considerados fontes de substâncias biologicamente ativas, principalmente contra microrganismos (OLIVEIRA, 2011).

Os compostos presentes nos óleos essenciais são capazes de atuar diretamente sobre o patógeno ou induzirem a resistência, neste caso envolvendo a ativação de mecanismos de defesa latentes das plantas (SCHWAN-ESTRADA, 2003).

Entre esses óleos destaca-se o óleo essencial de hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.), pertencente à família Lamiaceae muito conhecida por possui ação medicinal, também vem sendo utilizado com êxito no controle de fungos fitopatogênicos. Análises cromatográficas permitiram a identificação de 57 compostos no óleo essencial de *M. piperita*, sendo o mentol identificado como o componente majoritário do óleo (FREIRE, 2006). Conforme Haber et al. (2005), o mentol apresenta propriedades antiespasmódica, anti-inflamatória, antiúlcera e antiviral.

Outra forma de se obter o controle de fitopatógenos é através da utilização de microrganismos antagonistas: Laranjeira (2001) comentou sobre o controle alternativo de fitopatógenos através do uso de microrganismos antagonistas. Um dos mais utilizados é o fungo *Trichoderma* sp., que segundo Melo (1998) é um agente biológico que atua através de mecanismos de antibiose, micoparasitismo, competição e indução dos sistemas de defesa da planta. Podendo até atuar diretamente, infectando uma série de fungos fitopatógenos, através da ação de enzimas como quitinases, glucanases e proteases (HARMAN, 2004).

O *Trichoderma* spp. é capaz de produzir compostos metabólitos secundários. E algumas espécies ativam mecanismos de defesa nas plantas e na regulação do crescimento vegetal.

Dentre alguns metabólitos estão: ácido harziânico, alameticinas, antraquinonas, azafilonas, daucanas entre outros. Sendo que esses compostos liberados pelo *Trichoderma* são excretados nas fases de crescimento e esporulação fazendo com que possam inibir o crescimento de microrganismos.

Várias espécies de *Trichoderma* spp. estão entre os agentes de biocontrole mais comercializados e estudados no Brasil (LOPES, 2009), formulados como biopesticidas, biofertilizante e inoculantes de solo (HARMAN, 2004). O uso do *Trichoderma* sp. foi verificado em estudos para controle de *Rhizoctonia solani* Kuhn, *S. rolfsii*, *S. sclerotiorum* (Lib) de Bary, *Fusarium* spp. e *Pytium* spp. (MELO, 1998).

As atividades micoparasíticas necrotróficas, segundo Melo (1996), tem eficiência satisfatória em inúmeros fungos fitopatogênicos, mesmo aqueles com estruturas de resistência consideradas difíceis de serem atacadas por microrganismos tais como: escleródios, clamidósporos e microescleródios. Ainda, segundo Melo (1998), o *Trichoderma* sp possui característica micoparasita, pois tem a capacidade de detectar e localizar hifas de fungos suscetíveis, crescendo em sua direção, isso em virtude de respostas a estímulos químicos, produzidos pela hifa hospedeira, formando estruturas semelhantes a apressórios e enrolando-se em toda a sua extensão para, então, penetrar e digerir a hifa.

O gênero *Trichoderma* sp. é considerado um bom agente de controle microbiano, pois apresenta além de habilidades descritas acima, características essenciais, como ausência de impacto negativo ao meio ambiente, presença de estruturas de reprodução de fácil propagação, principalmente em substratos naturais (SPIEGEL, 1998), capacidade de sobreviver em ambientes desfavoráveis, além de conter populações de patógenos em condições de solo diferentes (VINALE, 2008).

Uma das principais espécies desse gênero é o *Trichoderma harzianum* Rifai. Monteiro et al (2010) relata que esse fungo secreta ao meio extracelular algumas enzimas que possuem a capacidade de degradação da parede celular tais como: endoquitinases, β -glicosidase, manosidases, fosfatases ácidas e proteases.

Essas enzimas secretadas pelo micoparasita hidrolisam a parede celular do hospedeiro liberando oligômeros da parede celular do patógeno ativando a expressão de genes envolvidos no micoparasitismo (VINALE, 2008). No estabelecimento do contato físico do micoparasita com o hospedeiro ocorre que hifas do fungo antagonista se aderem por estruturas especializadas chamadas 'apressórios' e enovelam-se ao redor das hifas do hospedeiro (SPIEGEL, 1998).

2.4 Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos

No âmbito geral, a indução de resistência tem sido estudada para as principais espécies cultivadas, envolvendo ativação de mecanismos de resistência através de vários agentes, chamados de elicitores, que pode estar ligado a resposta local ou sistêmica (HAMMER, 1999). Lorenzetti et al (2018) afirmaram ainda que a indução de resistência é a ativação dos mecanismos latentes de defesa das plantas contra patógenos, podendo ocorrer pelo tratamento destas com moléculas eliciadoras de origem biótica ou abiótica.

A resistência induzida pode ser ativada em plantas por uma série de substâncias, evitando ou atrasando a entrada e/ou a subsequente atividade do patógeno em seus tecidos, por meio de mecanismos de defesa próprios (ATHAYDE, 2005). Cavalcanti et al. (2006) e Resende et al. (2004) mencionam que a resistência induzida em plantas pode ocorrer por meio do tratamento com eliciadores de origem biótico (extratos vegetais, microrganismos ou partes desses) ou abiótico (substâncias químicas).

Acibenzolar-S-metil ou ASM é um dos indutores mais utilizados e é liberado para uso comercial. Ele pode atuar de diferentes formas, porém, sempre levando à ativação do sistema de defesa das plantas. O ASM é um análogo do AS, que age induzindo a ativação de genes que codificam proteínas PR e enzimas relacionadas com a produção de fitoalexinas e lignina (RESENDE, 2000).

Tratando-se do caso biótico, os extratos e óleos vegetais tem ganhado intensa procura para estudos relacionados com indução de resistência. Existem vários relatos na literatura de diversas substâncias de origem biológica que agem como indutores de resistência. Extratos de plantas no controle de fitopatógenos vêm recebendo grande importância nos trabalhos, tanto por sua ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, quanto pela indução de fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese (PRPs), indicando presença de algum composto eliciador (BARGUIL, 2005).

Resende et al. (2007), utilizando extrato de lobeira (*Solanum lycocarpum* St.-Hil) na indução de resistência em cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) contra a vassoura-de-bruxa (*Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora), observaram ativação de respostas de defesa das plantas. Segundo Bonaldo et al. (2004), o extrato aquoso de *Eucalipto citriodora* Hook foi capaz de induzir resistência local em plantas de pepino contra antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum lagenarium* (Pass.) Ellis & Halst.

Segundo Maia et al. (2014), o óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) induziu a resistência em videira contra o míldio e a mancha das folhas.

Dessa maneira, o desenvolvimento de uma agricultura que colabore com o meio ambiente, induz a busca de estratégias alternativas de controle, destacando-se o uso de compostos naturais capazes de estimular o sistema imune da planta.

Contudo existe vários fenômenos relevantes da resistência induzida, que podemos destacar: o aumento da expressão de genes relacionados à defesa, que estão presentes reações de hipersensibilidade, produção de compostos antimicrobianos, a explosão oxidativa e a ativação da rota dos fenilpropanóides, que que é a via biossintética da formação da lignina e outros metabólitos secundários. É sabido que estresses oriundos de atividades abióticas ou bióticas podem acarretar no acúmulo excessivo de espécies reativas de oxigênio, comumente relatada como EROs (MOLLER, 2007). Essas EROs são subprodutos do metabolismo aeróbico e fotossintético e são componentes de diversas vias de sinalização (FOYER, 2003).

Apesar da importância dessas vias de sinalização o excesso das EROs causa danos oxidativos em proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, caracterizando o estresse oxidativo secundário (BEN AMOR, 2005). Existe então, os mecanismos enzimáticos envolvidos na detoxificação das EROs, aos quais podemos destacar as enzimas: peroxidases de fenóis (POXs) e fenilalanina amônia-liase (FAL).

A explosão oxidativa é uma das respostas mais rápidas de defesa da planta após o reconhecimento do patógeno. Essa resposta corresponde à geração de espécies ativas de oxigênio (EAO's) (H_2O_2 , O_2^- , OH^-). As EAO's ocorrem normalmente no metabolismo celular, porém, quando acumuladas tornam-se tóxicas à célula (MOLLER, 2001). Para detoxificar essas EAO's acumuladas, a célula dispõe de vários mecanismos que estão envolvidos na proteção celular, como as moléculas antioxidantes, enzimas simples, e um sistema mais complexo de detoxificação. Conhecidos como "scavengers", várias enzimas reguladoras impedem a ação tóxica das EAO's à célula vegetal (RESENDE, 2003).

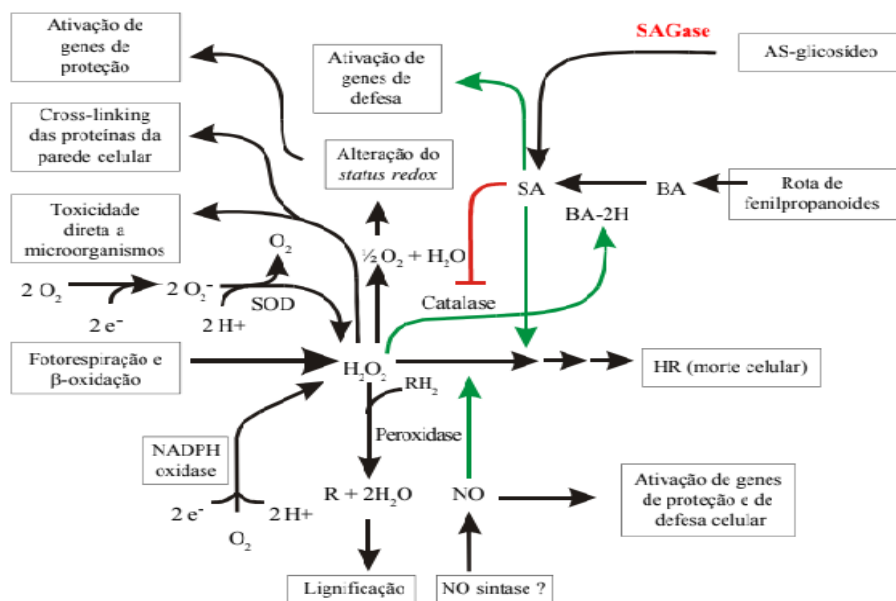
As atividades peroxidases fazem a redução da atividade de fenóis POXs, sendo apresentada de inúmeras isoformas distribuídas por diversos compartimentos celulares (SHIGEOKA, 2002). As POXs apresentam um caráter bifuncional no metabolismo oxidativo, pois podem utilizar o H_2O_2 para oxidar vários substratos por meio do seu ciclo catalítico peroxidativo e também podem produzir OH a partir do H_2O_2 por intermédio do seu ciclo catalítico hidroxílico (PASSARDI, 2004).

Contudo as POX de parede celular podem viabilizar o alongamento celular devido a produção de OH e a clivagem não enzimática dos polissacarídeos de ligação cruzada (LISZKAY, 2004). Por outro lado, estas enzimas também podem restringir o crescimento

celular por meio do espessamento da parede celular em decorrência da eliminação do H_2O_2 associada a polimerização dos precursores da lignina (PASSARDI, 2004).

Na Figura 1, Resende et al (2003) mostram as principais rotas e comportamentos das atividades peroxidases.

Figura 1 - Interconexões do H_2O_2 , óxido nítrico (NO) e ácido salicílico (AS) para a ativação e coordenação das múltiplas reações de defesa das plantas (adaptado de Hammond-Kosack; Jones, 2000).



Já a enzima FAL está envolvida no mecanismo de defesa da planta sendo responsável pela conversão da L-fenilalanina em ácido trans-cinâmico, que é um intermediário importante para produção de diversos fenilpropanóides. O metabolismo dos fenilpropanóides inclui uma série complexa de caminhos bioquímicos que proporcionam às plantas milhares de combinações. Muitos destes são intermediários na síntese de substâncias estruturais das células, como a lignina (BOATRIGHT, 2004).

Estes caminhos se ramificam gerando várias substâncias com funções essenciais no desenvolvimento da planta e interações ambientais, atuando enzimas fundamentais para a biossíntese da lignina (ALLINA, 1998). A FAL está relacionada com a resistência de plantas a patógenos, notadamente, por estar envolvida no primeiro passo da síntese dos

fenilpropanóides, com participação de fenilalanina e sua conversão em ácido- transcinâmico, catalisada pela FAL, resultando em compostos como fitoalexinas e, principalmente, lignina, que confere resistência à parede celular das plantas aos fitopatógenos (NAKAZAWA, 2001).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolamento e teste de patogenicidade

Foram feitas coletas de folhas de inhame apresentando sintomas de pinta-preta, oriundos de plantio no município de Satuba/AL. Os tecidos da margem da lesão foram submetidos a desinfestação: álcool a 50% por 30 segundos, hipoclorito de sódio a 0,1% (produto comercial com 2%) por dois minutos, lavados em água estéril e colocados para secar em papel de filtro esterilizado. Fragmentos do tecido (5 mm de comprimento) foram transferidos para placas de Petri contendo meio BDA (Batata – 200 g, Ágar – 18 g, Dextrose – 20 g e água destilada – 1000 mL) e incubados em estufa Biochemistry Oxygen Demand (BOD) à temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$ /12 de luz. Após sete dias, verificou-se o crescimento da colônia na placa de Petri. Posteriormente, o patógeno foi identificado, através de preparações microscópicas e preservado em BDA em temperatura ambiente.

O teste de Patogenicidade foi realizado em folhas sadias destacadas de inhame, que foram desinfestadas com hipoclorito de sódio a 0,1%, lavadas em água esterilizada, feridas e inoculadas com discos de micélio do fungo (5 mm). Para testemunha foram usados discos de meio BDA, sobre a superfície foliar. As folhas foram mantidas em câmara úmida por 7 dias e avaliadas quanto aos sintomas.

3.2 Efeito preventivo de produtos naturais sobre o controle da pinta preta do inhame em casa de vegetação (*Curvularia eragrostidis*)

Os locais experimentais foram dispostos em casa de vegetação do Laboratório de Fitopatologia do Centro de Ciências Agrárias (CECA), da Universidade Federal de Alagoas (UFAL, Rio Largo).

Para definição dos produtos utilizados e as melhores concentrações seguiram-se trabalhos anteriores de Carvalho (2016), Sales (2013) que caracterizaram o fungo e fizeram uma seleção de produtos com estudos *in vitro*.

Em casa de vegetação rizóforos de inhame cv. Da Costa foram plantados em vasos com capacidade de (3L) contendo substrato de plantio do tipo comercial Bioplant, composto por solo e restos vegetais, esterilizado por autoclavagem. Após desenvolvimento vegetativo (45 dias), as plantas de inhame foram pulverizadas (10mL/planta), 48h e 72h antes da inoculação do patógeno com os seguintes tratamentos: óleo de hortelã (100 μL); extrato de alho (20%); extrato de folhas de inhame (20%); *Trichoderma* sp. (2,0 g.L⁻¹); Acibenzolar-S-metil - ASM

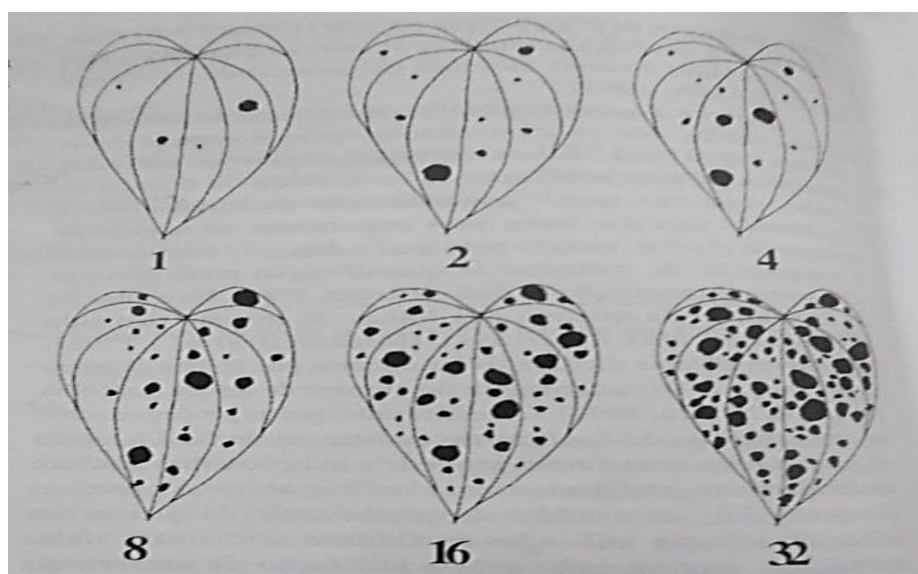
(0,15 g. L⁻¹ e 0,3 g L⁻¹); mancozeb (1,7 g L⁻¹) e água destilada esterilizada-ADE (testemunha). Os extratos vegetais e o óleo essencial foram esterilizados em UV. Em todos os tratamentos foi utilizado o coadjuvante Tween 20.

Os extratos foram preparados a partir de 20g de material vegetal, ao qual foram desinfestados e triturados em 100 mL de água destilada sendo filtrados em papel Wathman n° 1. Os demais produtos foram obtidos comercialmente.

As plantas foram inoculadas com uma suspensão de *C. eragrostides*, 10 ml/planta (1,7 x 10⁶ con. mL⁻¹), preparada a partir do cultivo do fungo em meio BDA por sete dias. A severidade da doença foi avaliada 15 dias após, pela escala diagramática estabelecida por Michereff et al. (2000) (Figura 4), onde foram avaliadas a severidade de 24 folhas/planta. Os dados de severidade de doença foram transformados para índice de intensidade de doença (ID), segundo Menezes; Silva (1997).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 7 x 2 + Testemunha (7 produtos e 2 épocas de tratamento) com quinze tratamentos e quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) (p<0,05) e, quando significativos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa SAS University Edition 2017.

Figura 4. Escala diagramática da queima das folhas de inhame (*Dioscorea cayennensis*), indicando níveis de 1, 2, 4, 8, 16, e 32% de severidade.



Fonte: Michereff, 2000.

3.3 Efeito curativo de produtos naturais no controle da pinta preta do inhame (*Curvularia eragrostidis*) em casa de vegetação

O ensaio curativo em casa de vegetação seguiu os padrões destacados no ensaio preventivo.

Rizóforos de inhame cv. Da Costa foram plantados, conforme o item 3.2. Após desenvolvimento vegetativo (45 dias) as plantas de inhame foram inoculadas com uma suspensão do patógeno ($1,7 \times 10^6$ con. mL⁻¹).

Dois e quatro dias após a inoculação, as plantas foram pulverizadas com 10mL dos tratamentos, selecionados no item 3.2: óleo de hortelã (100µL); extrato de alho (20%); extrato de folhas de inhame (20%); *Trichoderma* sp. (2,0 g L⁻¹); ASM (0,3 g L⁻¹); Ecolife® (2%); mancozeb (1,7 g L⁻¹) e ADE (testemunha). Os extratos vegetais e o óleo essencial foram esterilizados em UV. Em todos os tratamentos foi utilizado o coadjuvante Tween. A severidade da doença foi avaliada 15 dias após a aplicação dos tratamentos, pela escala diagramática estabelecida por Michereff et al (2000).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 15 tratamentos, em esquema fatorial 7 x 2 + testemunha (7 produtos x 2 períodos de tratamento) e quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) ($p < 0,05$) e, quando significativos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa SAS University Edition 2017.

3.4 Avaliação de produtos naturais no controle da pinta preta de inhame (*Curvularia eragrostidis*) em Campo (município de Satuba/AL)

O experimento em campo foi realizado na zona rural do município de Satuba/AL com as coordenadas: (9°34'07.4''S) (Latitude) (35°50'22.7''W) (Longitude) sob as seguintes condições climáticas: 1000 mm de precipitação média anual, com temperaturas médias máximas e mínimas entre 28 e 22 °C respectivamente e uma umidade relativa entorno de 73%. Os dados de climáticos foram obtidos dos sistemas de dados do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) e do Centro Nacional de Monitoramento e Alertas de Desastres Naturais (CEMADEN).

Foram preparados canteiros contendo substrato de plantio (composto orgânico e esterco de frango curtido) seguida do plantio dos rizóforos de inhame cv. Da Costa. Dois e quatro dias após o aparecimento de sintomas da queima das folhas (infecção natural), as plantas foram

pulverizadas com 10mL dos tratamentos, selecionados no experimento anterior, esterilizados em UV: óleo de hortelã (100 μ L), extratos vegetais de alho e extratos de folha de inhame (20% v/v). Foram usados também o fungo *Trichoderma* sp., mancozeb (2,0g L⁻¹), ASM (0,3g L⁻¹) e ADE (testemunha). O coadjuvante Tween 20 (1mL) foi adicionado a todos os tratamentos. A Severidade da doença foi avaliada quinze dias após os tratamentos, conforme Michereff et al (2000)

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso com 13 tratamentos, em esquema fatorial 6 x 2 + testemunha (6 produtos x 2 períodos de tratamento) e quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) ($p < 0,05$) e, quando significativos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa SAS University Edition 2017.

3.5 Avaliação de produtos naturais no controle da pinta preta do inhame (*Curvularia eragrostidis*) em Campo (município de Limoeiro de Anadia)

O experimento foi realizado na zona rural do município de (9° 46' 59.09"S) (Latitude), (36° 31' 23.28" W) (Longitude) – Limoeiro de Anadia/AL sob as seguintes condições climáticas: 600 mm de precipitação média anual, com temperaturas médias máximas e mínimas entre 28 e 22 °C respectivamente e uma umidade relativa entorno de 73%. Os dados de climáticos também foram obtidos dos sistemas de dados do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) e do Centro Nacional de Monitoramento e Alertas de Desastres Naturais (CEMADEN).

Foi realizado o plantio dos rizóforos de inhame cv. Da Costa em canteiros contendo substrato de plantio, seguindo as mesmas condições do ensaio anterior. Os tratamentos utilizados foram oriundos das melhores avaliações dos experimentos anteriores (exceto óleo de hortelã, por falta de disponibilidade): *Trichoderma* sp (2,0g L⁻¹); extrato de alho (20% v/v) ; ASM (0,3g L⁻¹): Mancozeb (2,0g L⁻¹) e ADE, foram pulverizados sobre as folhas de inhame, nos tempos de 48h e 72h após o aparecimento dos sintomas.. O espalhante adesivo Tween 20 (1mL) foi adicionado a todos tratamentos.

As Avaliações foram realizadas as quinze dias e 30 dias após o aparecimento dos sintomas, com o intuito de observar a persistência de ação dos produtos selecionados.

Delineamento experimental foi em blocos ao acaso com 5 tratamentos, em esquema fatorial 5 x 2 e quatro repetições Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA)

($p < 0,05$) e, quando significativos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa SAS University Edition 2017.

3.6 Avaliação dos produtos alternativos sobre a atividade de enzimas relacionadas com indução de resistência em folhas de inhame

Os produtos que apresentaram melhor efeito de controle nos experimentos foram novamente levados para casa de vegetação para serem avaliados na indução de atividade enzimática.

O efeito de não indução de resistência foi avaliado em plantas tratadas apenas com água e a resposta positiva de indução foi verificada com aplicação do indutor de resistência já registrado e comercializado Ecolife® na concentração de 2%.

Plantas de inhame aos 45 dias de idade receberam tratamentos com óleos essenciais e indutores selecionados que foram: o fungo *Trichoderma* sp. em dos períodos de aplicação 48hs e 72hs; Óleo de hortelã e óleo de cravo. Após 24 horas foram inoculadas com *C. eragrostidis*, utilizando-se 30 mL em cada planta de uma suspensão de inoculo ($1,7 \times 10^6$ con. mL^{-1}), preparada a partir do cultivo do fungo em meio BDA por sete dias, sendo a concentração de inoculo determinada através da contagem dos conídios em câmara de Neubauer. A testemunha foi inoculada e tratada apenas com ADE.

Para a realização das análises bioquímicas, foram coletadas folhas de inhame das plantas de cada tratamento, após 24, 48, 72 e 96 horas no período da manhã por volta das dez horas, com temperatura média em torno de 30°C. Após a coleta, as amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, acondicionadas em tubos falcon e armazenadas em freezer vertical (-86°C), para posterior análise.

3.6.1 Obtenção do extrato proteico

As amostras de folhas de inhame (0,5g), coletadas em plantas em casa de vegetação, foram homogeneizadas mecanicamente em 5mL de tampão de acetato de sódio 100mM (pH 5,0) e nitrogênio líquido, com auxílio de pistilo e cadinho de porcelana até a obtenção de massa homogênea, ao qual foi centrifugada à 10.000 rpm durante 20 minutos, a 4°C. O sobrenadante obtido foi utilizado para determinação da atividade enzimática POX, FAL e a quantificação de proteínas totais.

3.6.2 Quantificação de proteínas

O teste de Bradford foi empregado para a quantificação do conteúdo total de proteínas nas amostras (BRADFORD, 1976). Em 20 μL do sobrenadante foi adicionado 1 mL de reagente concentrado de Bradford, ao qual este foi preparado com: Ácido Coomassie Brillante Blue G-250 50mg que adere as proteínas, Etanol (95%) 50mL, ácido ortofosfórico 85% (H_3PO_4) 100mL e água destilada 850mL. Após 15 minutos, foi realizada a leitura de absorvância a 595 nm. As leituras da absorvância foram realizadas no espectrofotômetro (GENESYS™10S UV-Vis) e as reações para cada planta tratada foram feitas em duplicatas para cada repetição. Foi também realizado o preparo da solução de Albumina para curva de padronização dos dados. Para isso utilizou-se Albumina de soro bovino-BSA (H_2O) na concentração de $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ dissolvido em água Milli-Q, utilizando cubetas de vidro de 2 mL com o branco sendo apenas H_2O e Bradford com duas repetições para cada ponto da curva.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 6 tratamentos e 5 repetições. As análises estatísticas foram realizadas com os valores calculados de atividade enzimática. Os dados foram submetidos à análise de variância, e quando F foi significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade, através do programa estatístico GraphPad Prism 7.0.

3.6.3 Determinação da atividade de FAL

A atividade da enzima FAL foi avaliada com 200 μL do extrato enzimático, 1500 μL de Tris HCL 100 mM, 500 μL de Fenilalanina 30mM (substrato) com coeficiente de extinção $104\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ e 800 μL de ADE. Os tubos de ensaio contendo as reações foram mantidos em banho-maria à 40 °C por 60 minutos. Após o período de incubação, a reação foi paralisada com a adição de 100 μL de ácido clorídrico a 5,0 M. No ensaio foram realizadas duas reações de referência.

A primeira constando apenas o substrato (Branco 1) e a segunda contendo o extrato proteico (Branco 2). O Branco 1 foi preparado adicionando-se 1500 μL de Tris HCl 100 mM (pH 8,8), 500 μL de Fenilalanina 30 mM e 1000 μL de ADE. O Branco 2 consistirá de 1500 μL de Tris HCL100 mM, 200 μL do extrato enzimático e 1300 μL de ADE. A leitura foi feita em cubeta de quartzo, por meio de variação na absorvância em comprimento de onda de 290 nm, a 25 °C e expressa em unidade de absorvância $\text{min}^{-1}\text{ mg}$ de proteína $^{-1}$ (UMESHA, 2006). Os valores de leitura de absorvância observados decrescentes.

3.6.4 Determinação da atividade POX

A atividade POX foi determinada a partir da mistura de uma reação, contendo 200 μ L do extrato proteico e 2,8 mL de uma solução preparada um pouco antes, contendo 250 μ L de guaiacol por reação a 1.7% com coeficiente de extinção de 26,6 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ e 306 μ L de peróxido de hidrogênio em 100mL de tampão fosfato 0,01M (pH 6,0), com um total para 42 reações. Sendo realizadas duplicatas para cada reação. Para dissolução do guaiacol foi necessário a utilização do aparelho ultrasonic por cerca de 3 min.

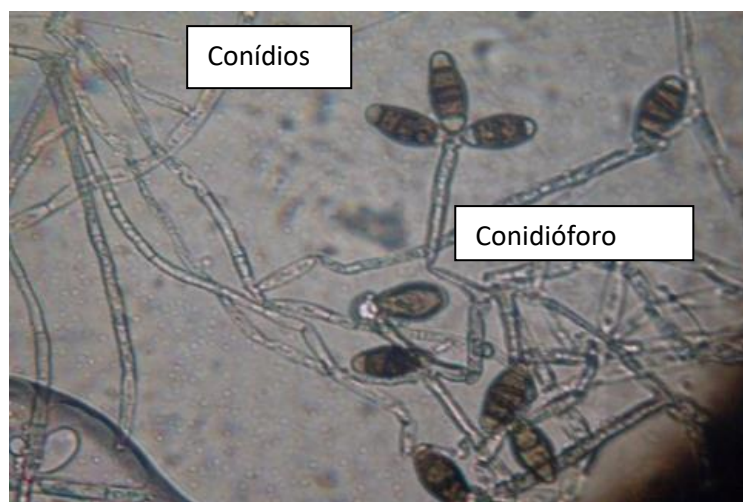
A atividade enzimática foi analisada em espectrofotômetro, observando-se a variação na absorbância em comprimento de onda de 470nm, a aproximadamente 25°C e expressa em unidade de absorbância $\text{min}^{-1} \text{mg de proteína}^{-1}$ (KUHN; PASCHOLATI, 2010). A atividade foi medida durante três minutos em intervalo de 15 segundos e observado os valores de leitura de absorbância crescentes.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Identificação do isolado

A cultura do patógeno apresentou colônias circulares de aspecto cotonoso e de coloração escura com a presença de grande quantidade de conidióforos e conídios. Os conidióforos de *C. eragrostidis* se apresentaram escuros, septados, produzindo os conidiosporos simpodialmente. Os conidiosporos apresentavam-se escuros, retos, com quatro células e septo central espesso.

Figura 5 - Conidioforos e conídios de *Curvularia eraglostidis* isolado de folhas de inhame com sintomas de queima.



Fonte: Autor, 2017.

4.2 Patogenicidade do isolado

Sete dias após a inoculação do patógeno houve o aparecimento de sintomas semelhantes aos coletados no campo, sendo eles: manchas necróticas, circulares, de coloração marrom e halo amarelado. Enquanto as testemunhas permaneceram sadias (Figura 6). O patógeno foi então re-isolado em meio BDA e observado quanto as características morfoculturais, confirmando-se a patogenicidade do isolado.

Figura 6- Folhas de inhame com sintomas da pinta preta do inhame após inoculação com *Curvularia eragrostidis*



Fonte: Autor, 2017

4.3 Efeito preventivo de produtos naturais sobre a severidade da pinta preta do inhame em casa de vegetação

Os resultados do efeito de produtos naturais sobre a intensidade da pinta preta do inhame, apresentados nas Figuras 7 e 8, mostram que os tratamentos com extrato da folha de inhame, o fungo *Trichoderma sp.*, o óleo de hortelã, aplicados 72h antes da inoculação do patógeno e o fungicida mancozeb, aplicados 48h e 72h antes da inoculação do patógeno foram capazes de reduzir a severidade da pinta preta do inhame, apresentando as menores porcentagens de severidade da doença, diferindo significativamente dos demais tratamentos.

O tratamento das plantas com *Trichoderma sp.* e ASM 0,15g L⁻¹ aplicados 48h antes da inoculação do patógeno e ASM 0,15 e 0,30g L⁻¹ aplicados 72h antes da inoculação do patógeno não diferiram da Testemunha. Os tratamentos das plantas com extratos de alho, aplicados 48 e 72h antes da inoculação do patógeno; extrato de folha de inhame, óleo de hortelã e ASM 0,30, aplicados 48h antes da inoculação do patógeno se comportaram como conducentes a doença, apresentando porcentagens de severidade da queima superiores à da testemunha.

Figura 7- Efeito de Produtos naturais, *Trichoderma sp.* e mancozeb sobre a severidade da pinta preta do inhame, aplicados antes da inoculação de *Curvularia eragrostidis*

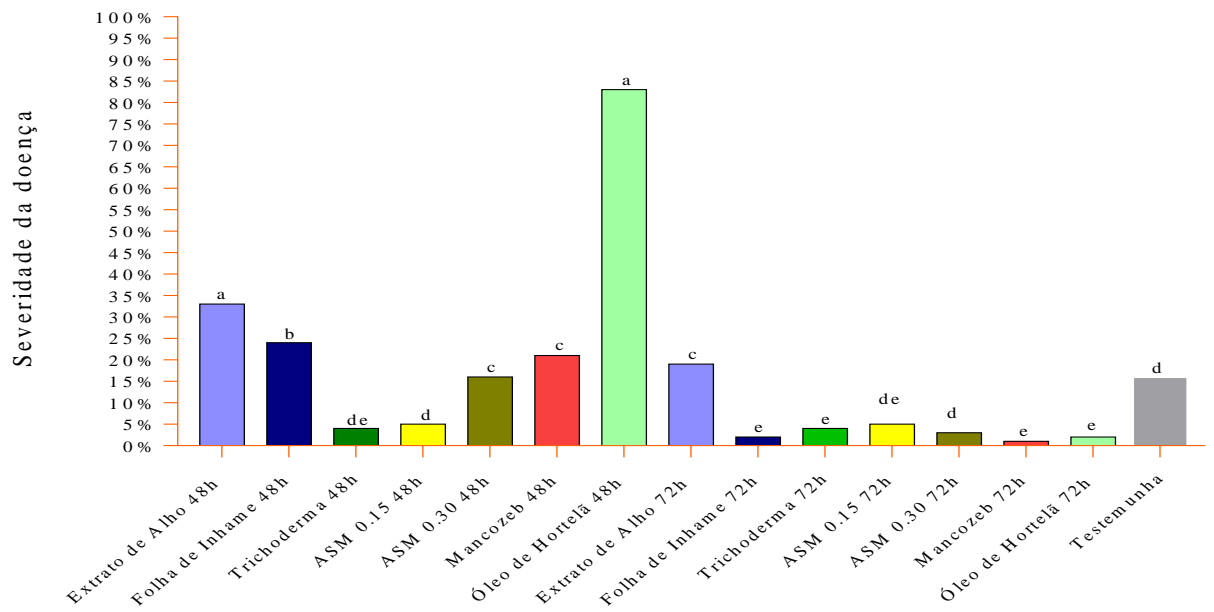


Figura 8. Severidade da pinta preta em plantas de inhame tratadas com produtos naturais, *Trichoderma sp.* e fungicida antes da inoculação de *Curvularia eragrostidis*



Comparando-se os resultados *in vivo* com os encontrados em experimento *in vitro* (CARVALHO, 2016), observa-se comportamentos diferentes dos produtos naturais: o extrato de alho que proporcionou altas porcentagens de inibições na taxa de esporulação do patógeno, quando utilizados sobre o hospedeiro comportou-se como conducente, apresentando resultados superiores a testemunha, enquanto o fungicida mancozeb, que *in vitro* havia sido inexpressivo, proporcionou a melhor taxa de controle da doença. O extrato de inhame manteve sua capacidade de inibir a ação do patógeno.

Vários fatores, possivelmente podem ter influenciado esse comportamento dos produtos naturais: o ambiente controlado em que o experimento *in vivo* permaneceu; interações com o hospedeiro (inhame); a volatilidade do produto utilizado, etc.

Sales (2014) obteve resultados que corroboram com os encontrados nesse trabalho em relação aos tratamentos com óleo de hortelã, *Trichoderma* sp. e mancozeb, mas discorda com relação aos tratamentos com extrato de alho, que em seu trabalho com a pinta preta do inhame, foi capaz de reduzir a severidade da doença apresentando a menores porcentagem da doença. Almeida et al (2013) utilizando extratos vegetais na proteção de plantas de inhame contra *Curvularia eragrostidis* e *Phyllosticta* sp. observaram que houve redução da incidência dos dois patógenos para as diferentes concentrações dos extratos testados, quando comparados com a testemunha, e as menores médias da área da curva de progresso da doença foram obtidas para tratamentos com manipueira e folhas de juá a 25%.

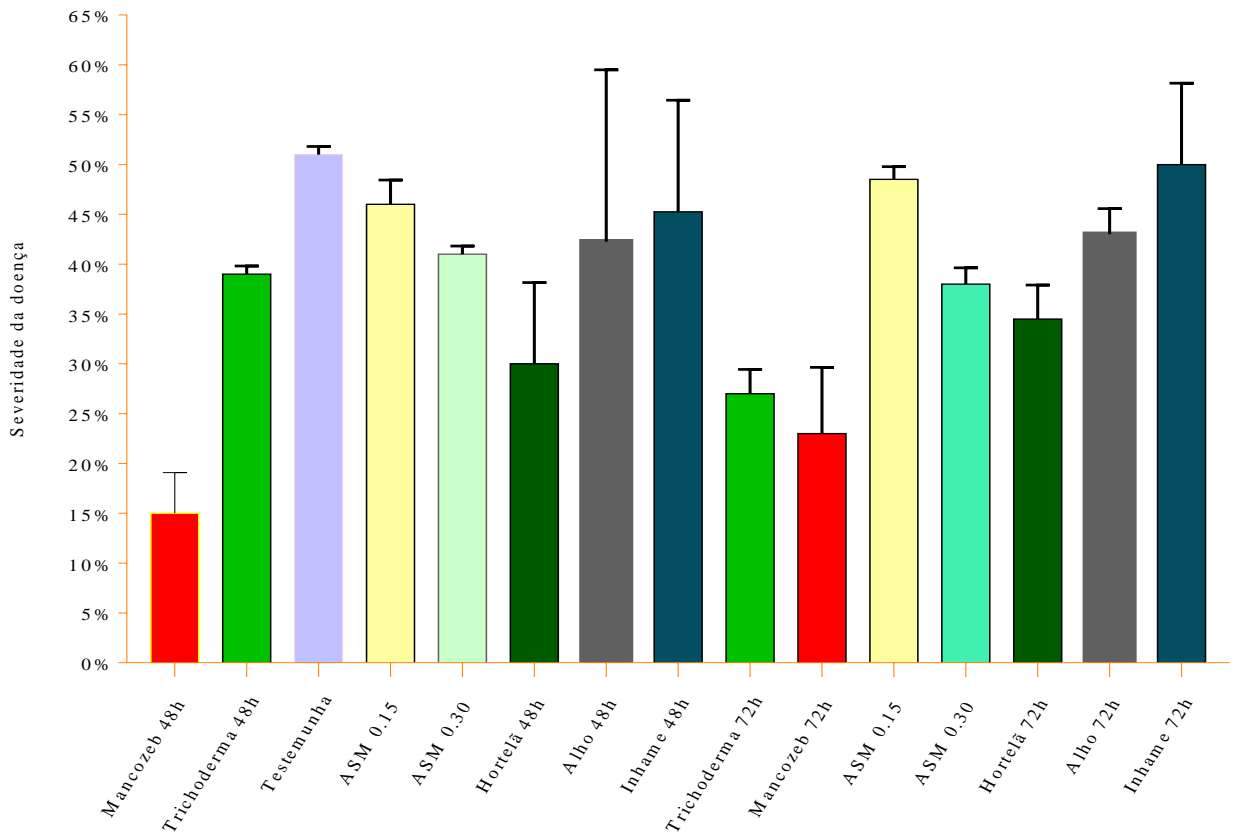
4.4 Avaliação do efeito curativo de produtos naturais no controle da pinta preta do inhame (*Curvularia eragrostidis*) em casa de vegetação

De maneira geral, os produtos naturais, *Trichoderma* sp. e indutores de resistência, em casa de vegetação, proporcionaram uma redução na severidade da doença, apresentando uma variação dos resultados encontrados, que podem ser visualizados na Figura 9.

As reduções da severidade da pinta preta do inhame foram de 85%, quando as plantas foram tratadas com o fungicida mancozeb, aplicado 48hs após a inoculação do patógeno; 72% com o fungo *Trichoderma* sp., aplicado 72h após a inoculação e de 60% com o óleo de hortelã, aplicado 48hs após a inoculação e o fungicida mancozeb, aplicado 72hs após a inoculação. Estes tratamentos não apresentaram diferenças significativas entre si e foram os únicos a diferirem da testemunha. Os tratamentos com *Trichoderma* sp. e fungicida, aplicados 72hs após a inoculação do patógeno, não diferiram dos tratamentos com *Trichoderma* sp., fungicida

mancozeb, Alho e ASM ($0,3\text{g L}^{-1}$) aplicados 48hs após a inoculação do patógeno e ASM ($0,3\text{g L}^{-1}$) e hortelã, aplicados 72hs após a inoculação do patógeno.

Figura 9 - Efeito de Produtos naturais, *Trichoderma* sp. e mancozeb sobre a severidade da pinta preta do inhame, aplicados após a inoculação de *Curvularia eragrostidis*.



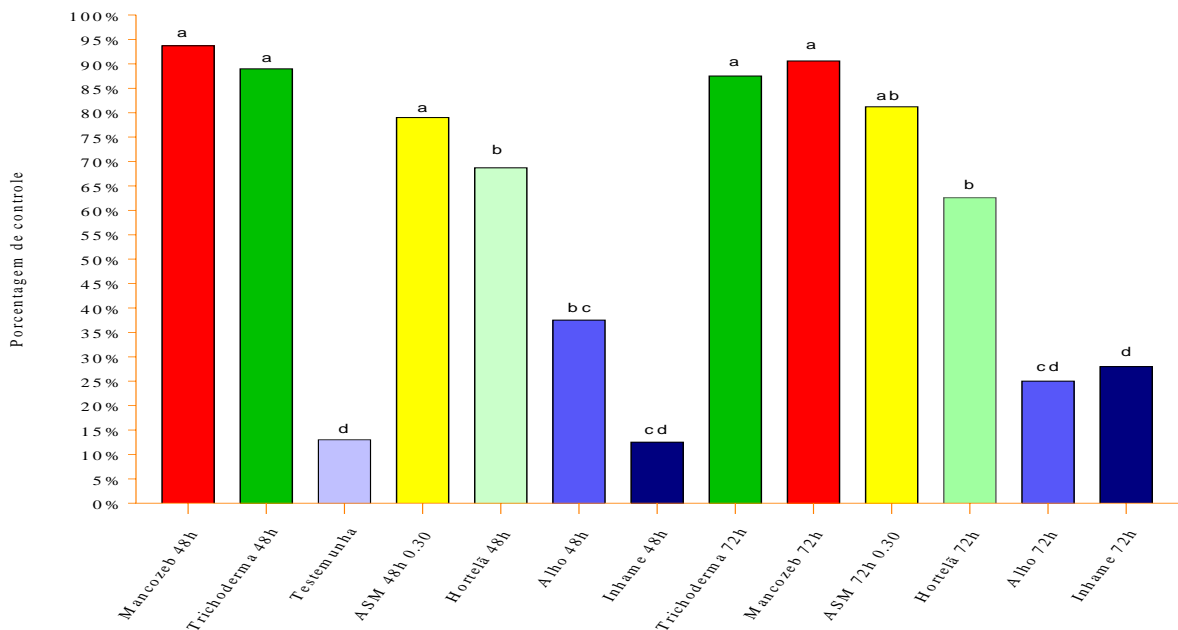
Fonte: Autor (2018).

O fungicida Mancozeb utilizado em todas as etapas experimentais é um ditiocarbamato, com um complexo de zinco, salientando a não recomendação existente do produto para a cultura, porém sua utilização no campo pelos agricultores já é amplamente feita, justificando a inserção do produto nas avaliações.

4.5 Avaliações do efeito de produtos naturais sobre a pinta preta do inhame em campo (Satuba- AL)

O efeito de produtos naturais, *Trichoderma* sp. e indutores de resistência sobre o controle da pinta preta do inhame (*C. eragrostidis*) podem ser verificados na Figura 10. Observa-se que dentre os tratamentos, o fungicida mancozeb, o fungo *Trichoderma* sp. e o indutor ASM, aplicados 48h e 72h após o aparecimento de sintomas da doença e o óleo de hortelã, aplicado 48h após o aparecimento de sintomas da doença, proporcionaram as maiores taxas de redução da severidade da doença, 93,7%; 90,6%; 89%; 87,5%; 79%, 81,2% e 68,7%, respectivamente. Por sua vez, o tratamento das plantas de inhame com o indutor ASM 72h não diferiu dos tratamentos com o óleo de hortelã 72h (62,6%) e extrato de alho 48h (37,5%) que por sua vez não diferiu dos tratamentos com extrato de alho 72h (25%) e extrato de folhas de inhame 48h (12,5%). Os demais tratamentos apresentaram comportamento semelhante à testemunha.

Figura 10 - Efeito de produtos naturais, *Trichoderma* sp., ASM e Mancozeb sobre a pinta preta do inhame (*Curvularia eragrostidis*), aplicados 48h e 72h após o aparecimento de sintomas da doença no município de Satuba.



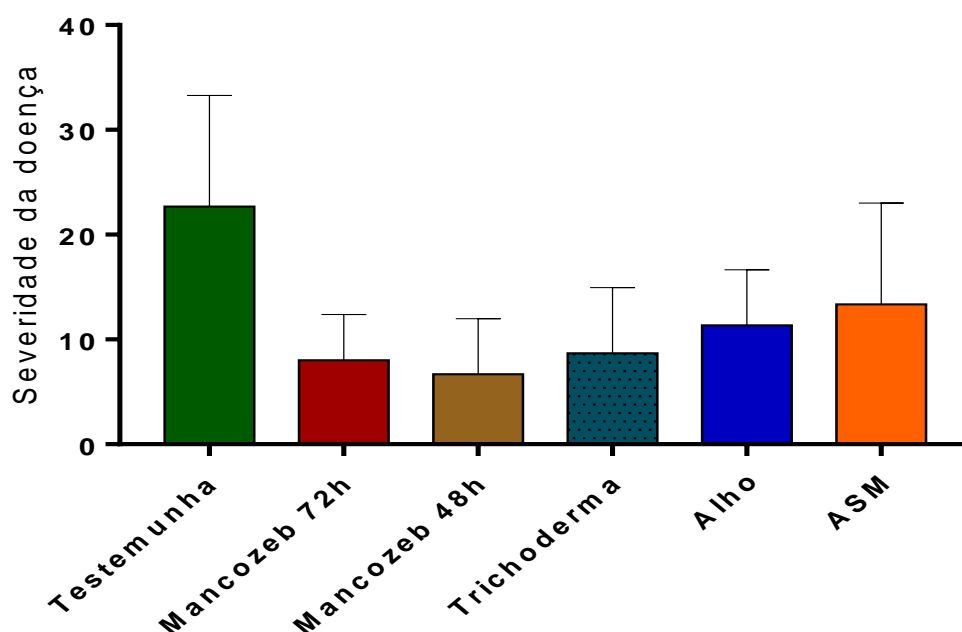
Fonte: Autor (2018).

4.6 Avaliações do efeito de produtos naturais sobre a pinta preta do inhame em campo (Limoeiro de Anadia – AL)

No município de Limoeiro de Anadia os tratamentos obtiveram desempenho semelhante ao campo experimental anterior. As Figuras 11 e 12 mostram os resultados das análises feitas em campo, onde todos os tratamentos proporcionaram redução na severidade da doença, que variaram de acordo com a época de avaliação.

Na primeira avaliação, aos quinze dias, o tratamento com o fungo *Trichoderma* sp., o fungicida mancozeb, aplicado 72h e 48h após o aparecimento de sintomas, extrato de alho e ASM, aplicados 48h após o aparecimento de sintomas proporcionaram, respectivamente, reduções de 77,3 %, 63,6% e 59,1%, 45,5% e 31,81%.

Figura 11 - Efeito de produtos naturais, *Trichoderma* sp., ASM e Mancozeb sobre a pinta preta do inhame (*Curvularia eragrostidis*), após o tratamento das plantas (Limoeiro de Anadia-AL).

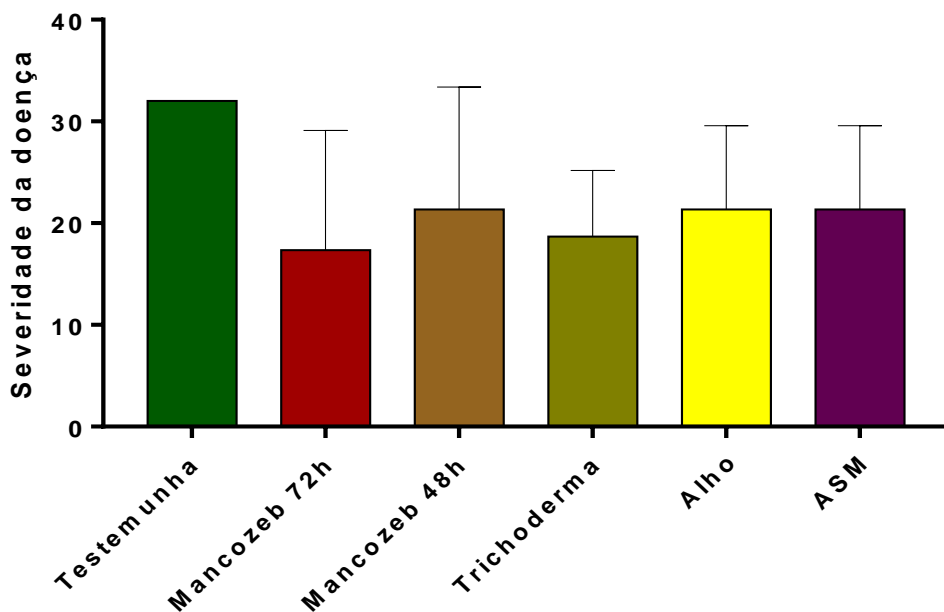


Fonte: Autor (2018).

Na segunda avaliação, aos 30 dias, o fungicida mancozeb, aplicado 72h e 48h após o aparecimento dos sintomas, que proporcionaram reduções de 46,9% e 40,7% e *Trichoderma* sp. com redução de 40,7% foram os que induziram os melhores resultados. Faz-se uma ressalva para o fungicida mancozeb, aplicado 48h, que, na segunda avaliação, apresentou uma

diminuição na sua capacidade em reduzir a severidade da doença, tendo comportamento semelhante aos tratamentos com extrato de alho e ASM (34,4%).

Figura 12 - Efeito de produtos naturais, *Trichoderma sp.*, ASM e Fungicida sobre a queima das folhas do inhame (*Curvularia eragrostidis*), trinta dias após o tratamento das plantas (Limoeiro de Anadia-AL).



Fonte: Autor (2018).

Nas duas avaliações (15 e 30 dias) o antagonista *Trichoderma sp.* apresentou comportamento estável, com capacidade de reduzir a severidade da queima das folhas do inhame, mostrando o potencial da utilização desse agente de biocontrole para o manejo da doença.

A ação curativa do fungicida Mancozeb e da sua eficiência, independente do tempo de aplicação, pode estar ligada a ação desse produto que age em vários sítios do patógeno, e também impede a penetração em caso de nova infecção (GISI, 2008).

Referente ao uso de *Trichoderma sp.* para biocontrole de patógenos de parte aérea, os resultados obtidos nesta pesquisa não foram bem elucidados, necessitando de estudos complementares para o esclarecer os mecanismos de ação. Contudo para outras enfermidades de plantas já se tem vários estudos comprovando sua ação antimicrobiana, Pastrana et al (2016) avaliando as atividades antagônicas de *Bacillus megaterium*, *B. laterosporus* e *Trichoderma asperellum*, através de bioformulados contra a associação de *Macrophomina phaseolina* e *F*

solani ca.usadores de podridões em morango, observou *in vitro* e *in vivo* a ação preventiva e curativa dos biocontroladores. Na ação preventiva o *T. asperellum* reduziu a incidência de podridão de carvão causada por *M. phaseolina* variando de 44% a 65% na estufa e casa de vegetação. Também reduziu a porcentagem de necrose da coroa e raiz causada por *F. solani* (até 100% na estufa e até 81% em condições de campo).

Segundo Schwan-Estrada (2008) os mecanismos ditos como estruturais se relacionam com aqueles que interferem na penetração e/ou colonização dos tecidos pelos patógenos. Enquanto que os bioquímicos envolvem substâncias capazes de inibir o ataque ou o desenvolvimento dos patógenos no hospedeiro. Dentro dessas afirmações, é possível correlacionar com os percentuais de redução da severidade da doença no tratamento utilizando o fungo *Trichoderma* sp.

Segundo Infante et al (2009), os mecanismos de ação do agente biocontrole de *Trichoderma* sp, estão envolvidos na concorrência por espaço e nutrientes, micoparasitismo, antibiose, secretação de enzimas, produção de compostos inibitórios. Além de induzirem mecanismos de defesa fisiológicos e bioquímicos, como ativação na planta de compostos relacionados à indução de resistência (HARMAN, 2004b), com a desintoxicação de toxinas excretadas por patógenos e desativação destas enzimas durante o processo de infecção; a solubilização de nutrientes, que em sua a forma original não é acessível às plantas (HAMAM, 2004a).

Santos (2011) relata a presença de monoterpênos no óleo essencial de hortelã como o Menthol e Mentona, atribuindo a essas substancias a ação antifúngica. Romero (2013), observou a ação desses monoterpênos, no crescimento micelial e germinação de conídios de *Corynespora cassiicola*, obtendo inibição completa no crescimento micelial e na germinação de conídios na maior concentração utilizada (5000 ppm). Na concentração de 1000 ppm, observou-se inibição de 100% do crescimento micelial e de 76,0% da germinação dos conídios. O mentol comportou-se de forma semelhante nos testes avaliados. Para as concentrações de 5000 e 1000 ppm, observou-se completa inibição tanto do crescimento micelial, quanto da germinação de conídios.

Apesar dos dados referirem a experimento *in vitro*, as características observadas são muito importantes para explicar a dinâmica de ação do óleo essencial de hortelã com tais substancias majoritárias podemos afirmar que ambos trabalhos, apesar do patossistema ser diferente, agindo sobretudo na fase de infecção e colonização do patógeno, pois verificou-se a formação de uma camada de aspecto oleoso nas folhas, quando aplicadas com esse produto.

4.7 Avaliação dos produtos alternativos sobre a atividade de enzimas relacionadas com indução de resistência em folhas de inhame

As Figuras 13 e 14 demonstram os principais resultados das atividades enzimáticas estudadas. O primeiro gráfico mostra o comportamento da enzima Fenilalanina amônia-liase, ao qual podemos observar o aumento nos picos de atividade enzimática logo no primeiro dia de avaliação em todos os tratamentos utilizados, incluindo a testemunha.

Sobretudo apenas o tratamento com o indutor de resistência já registrado Ecolife® diferiu estatisticamente da testemunha no primeiro dia, porém ao decorrer dos dias avaliados os tratamentos foram obtendo comportamentos bem variados vindo a ter diferença significativa no último dia de avaliação para essa atividade que mostrou-se ser um processo não linear, entrando assim em concordância com Valderrama, Marangoni e Lemente (2001), que observaram esse tipo de comportamento em seus estudos com enzimas em macieiras. Segundo Furtunato (2002), as enzimas podem se tornar novamente ativas após a inativação térmica, fenômeno conhecido por renaturação. Fato esse que pode ter ocorrido, para esse produto, nos estudos na casa de vegetação.

No segundo e terceiro dia, apenas o fungo *Trichoderma* sp ,aplicado 72h após a inoculação, obteve diferença significativa frente a testemunha.

Clavijo e Cotes (1998), relataram que as sementes de tomate tratadas com estirpes de *Trichoderma* sp. obtiveram um aumento de enzimas hidrolíticas com atividade de β -1,3-glucanase e endocitinase. Já, Castillo *et al.*, (2007), utilizando a técnica de microarray, descobriu que plantas de tomate híbrido Rocio® tratadas com *Trichoderma koningiopsis* expressaram 42 genes diferenciais, em contraste com o tratamento teste. Alguns desses genes encontrados estão relacionados às categorias funcionais de transporte, tradução de sinal, resposta hormonal e sinalização.

Ainda em concordância com os aspectos supracitados, o agente *Trichoderma* sp manteve a atividade enzimática no último dia de avaliação para enzima FAL, em conjunto com o Ecolife® e o óleo essencial de hortelã, como no trabalho de Castillo et al (2007) possivelmente há genes envolvidos nas respostas diretas de indução de resistência.

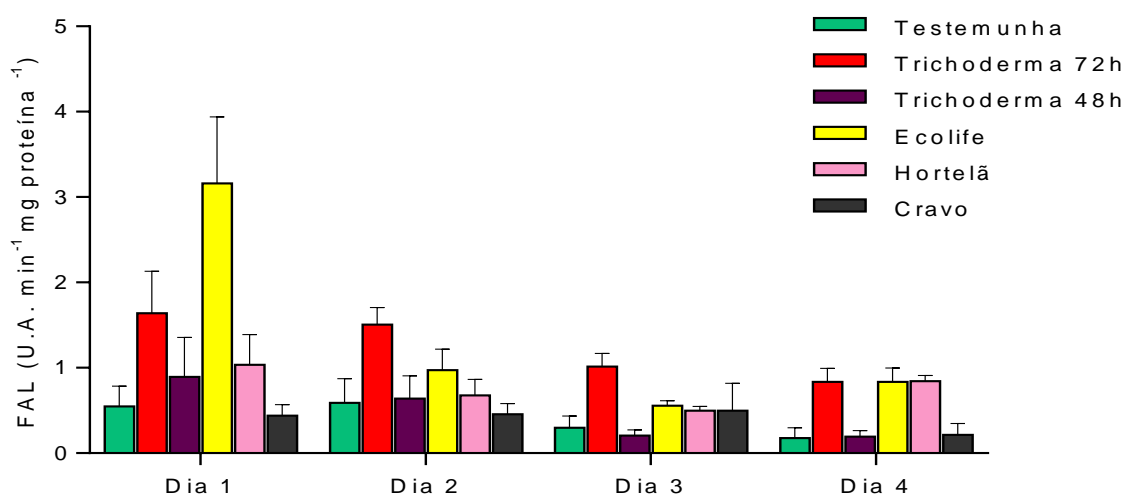
Tratando-se da ação de óleos essenciais sabe-se que, por exemplo: a aplicação preventiva de óleo essencial de *Cymbopogon. citratus* em folhas de tomate aumentou a atividade enzimática local em folhas tratadas e sistêmico em folhas não tratadas, além disso, também promoveu a formação de papilas e lignificação de células epidérmicas, que contribuíram para o controle da pinta preta do tomateiro em estudos realizado por Itako (2008).

Com isso podemos reafirmar a atividade elicitora de óleos essenciais, bem como validar a ação do óleo essencial de hortelã para atividade FAL nesse presente trabalho.

Pinheiro et al (1999) em seus estudos afirmou que a planta pode desencadear respostas bioquímicas estresses bióticos e abióticos como a produção de enzimas ou levar a alterações estruturais no vegetal dificultando a entrada do agressor e limitando seu reconhecimento entre este e a planta.

De acordo com Stangarlin et al (2011), a FAL é uma enzima responsável pela conversão de L-fenilalanina em ácido *trans-cinâmico*, que é importante para a produção de fenilpropanoides, como a lignina, e flavonoides, como as fitoalexinas. Em virtude disso, podemos indicar que nesse trabalho de maneira geral houve o aumento da atividade FAL, já que na figura VIII mostra aumentos expressivos no primeiro dia avaliação da atividade enzimática.

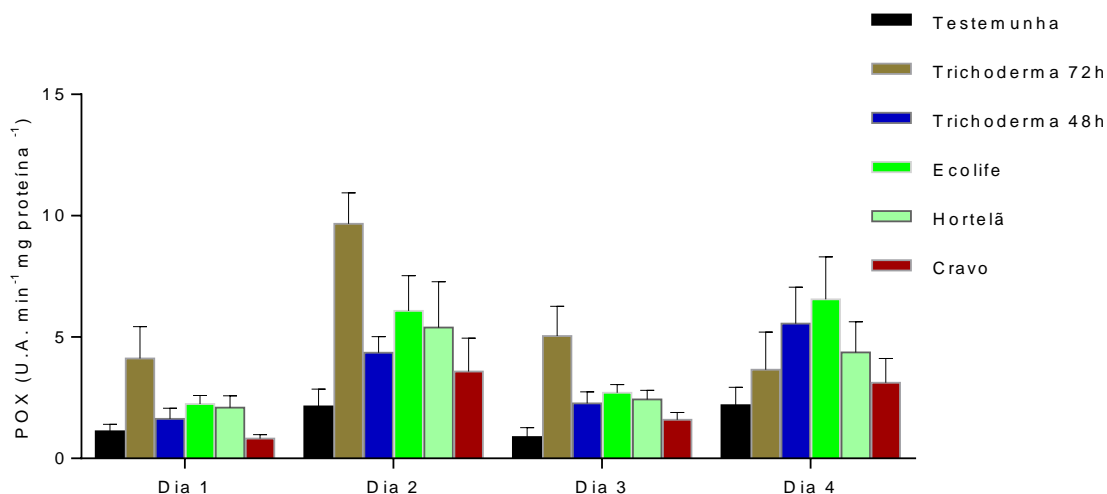
Figura 13 - Atividade de fenilalanina-amônia liase (FAL) em folhas de inhame induzidas com óleo essencial de hortelã, extrato de cravo, Ecolife®, *Trichoderma sp* e testemunha (ADE), às 24, 48, 72 e 96 horas após a inoculação com *Curvularia eragrostidis*.



Fonte: Autor (2019).

O comportamento da atividade Peroxidase de fenóis (POX) é descrito na Figura 14. Inversamente ao ocorrido na atividade FAL, os picos de atividade demonstraram-se mais linearidade, mantendo um certo padrão por todos os dias de avaliação. Contudo o tratamento com o fungo antagonista *Trichoderma sp.* foi o único a apresentar diferença estatística frente ao controle.

Figura 14 Atividade de peroxidase de fenóis (POX) em folhas de inhame induzida com óleo essencial de hortelã, extrato de cravo, Ecolife®, *Trichoderma* sp e testemunha (ADE), às 24, 48, 72 e 96 horas após a inoculação com *Curvularia eragrostidis*.



Fonte: Autor (2019)

Segundo Troian (2014) o tratamento com biocontroladores como o agente *Trichoderma* sp induz o aumento na síntese de produtos de defesa vegetal como proteínas de defesa: quitinasas, β -1,3- glucanases e peroxidases além de compostos sinalizadores. Assim como, a produção de antibióticos, e a inativação de enzimas do fungo fitopatogênico (TSENG, 2008). Nesse trabalho, portanto podemos correlacionar a alta capacidade múltipla do *Trichoderma* sp e seus mecanismos de ação com os resultados obtidos pois além dos bons resultados em campo, com esse nítido incremento na atividade peroxidase podemos afirmar a ação antifúngica e indutora de resistência do antagonista.

Em estudo realizado por Troian (2014) afirma em seus trabalhos que a espécie *Trichoderma virens* apresentou expressão sistêmica aumentada de quitinase (Classe I), β 1-3 glicanase, peroxidase (POD₆), hidroximetilglutarilCoA redutase e lipo-oxigenase, todas proteínas relacionadas a defesa. E apresentaram resistência a infecção pelo fungo fitopatogênico *Coletotrichum* sp e acúmulo de peróxido de hidrogênio em folhas e cotilédones (DJONOVIC, 2006).

5 CONCLUSÕES

O extrato da folha de inhame (20%), o fungo *Trichoderma sp.* ($2,0 \text{ g L}^{-1}$), o óleo de hortelã ($100\mu\text{L}$), aplicados 72h antes da inoculação do patógeno e o fungicida mancozeb ($1,7 \text{ g L}^{-1}$), aplicados 48h e 72h antes da inoculação do patógeno são capazes de reduzir a severidade da pinta preta do inhame (*C. eragrostides*).

O fungicida mancozeb ($1,7 \text{ g L}^{-1}$), o fungo *Trichoderma sp* ($2,0 \text{ g L}^{-1}$) e o óleo de hortelã ($100\mu\text{L}$) são eficientes no controle da pinta preta do inhame tratamento de folhas de inhame quando aplicados até 72 horas após a inoculação de *Curvularia eragrostidis*, em condições de casa de vegetação.

O fungo *Trichoderma sp* ($2,0 \text{ g L}^{-1}$), aplicado 72h e o óleo de hortelã ($100\mu\text{L}$), aplicado 48h após o aparecimento de sintomas da pinta preta do inhame, reduzem a severidade da doença. Sendo o agente de biocontrole persistente na área após 30 dias de sua aplicação.

O antagonista *Trichoderma sp* ($2,0 \text{ g L}^{-1}$) induz a resistência da cultura estudada ativando as enzimas de Fenilalanina-amônia liase (FAL) e Peroxidase de fenóis (POX) relacionadas aos processos de defesa das plantas.

REFERÊNCIAS

- AGROFIT. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 22/02/2019.
- ALLINA, S. M. et al. 4-coumarate: coenzyme A ligase in hybrid poplar: properties of native enzymes, cDNA cloning, and analysis of recombinant enzymes. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 116, n. 2, p. 743-754, Feb. 1998.
- ALMEIDA, D. O. C. de; SOUZA, J. T. de; MOREIRA, R. F. C. Uso de extratos vegetais na proteção de plantas de inhame contra *Curvularia eragrostidis* e *Phyllosticta* sp. **Agrotrópica**. Ilhéus, Bahia; Centro de Pesquisas do Cacau, 2013.
- ASCOM/SEAGRI-AL. **Benefícios para a saúde**. Disponível em: <www.correiodosmunicipios-al.com.br/noticias/?vcod=6980>. Acesso em: 07/02/2014.
- ATHAYDE S. C. et al. Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. **Piracicaba: FEALQ**. p. 51-80. 2005.
- AZEVEDO, J. N. de; DUARTE, R. L. R. **Cultivo do Cará da Costa**. Teresina/CNPAMN. 19p, 1997.
- BARGUIL, B. M. et al. Effect of extracts from citric biomass, rusted coffee leaves and coffee berry husks on *Phoma costarricensis* of coffee plants. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v. 30, n.5, p. 535-537, 2005.
- BEN AMOR, N. et al. Physiological and antioxidant responses of the perennial halophyte *Crithmum maritimum* to salinity. **Plant Science** 168: 889-899. 2005.
- BOATRIGT, J. et al. Understanding in vivo benzenoid metabolism in petunia petal tissue. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 135, n. 4, p. 1993-2011, Aug. 2004.
- BONALDO, S.M. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatologia Brasileira** 29:128-134. 2004.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dyebinding. **Analytical Biochemistry** 72: 248-254. 1976.

CARVALHO, V. N. **Substâncias naturais e indutor de resistência no controle da Queima das folhas do inhame** Rio Largo: UFAL – CECA, 2016. (Trabalho de conclusão de curso).

CASTILLO, F. et al. Gene expression of tomato plants treated with *Trichoderma koningii*. **CD-ROM de memorias (Presentaciones orales) 6LABS**; 2007.

CAVALCANTI, F. R. et al. Acibenzolar-S-metil e Ecolife® na indução de respostas de defesa do tomateiro contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 4, p. 372-380, jul./ago. 2006.

CEMADEN. 2018. **Centro Nacional de Monitoramento e Alertas de Desastres Naturais**. Disponível em: <https://www.cemaden.gov.br/> Instituto Nacional de Meteorologia. Acesso em: 26/12/2018.

CLAVIJO, G.; COTES, A.M. Evaluación de la actividad quitinasa en procesos de control biológico de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* en tomate, mediante tratamientos de pregerminación controlada de semillas en presencia de *Trichoderma koningii*. **Revista Colombiana de Biotecnología**. 1998; 1:58-66.

DJONOVIC S.; POZO M.J. et al. A proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic resistance. **Mol Plant Microbe Interact**. 2006 Aug;19(8):838-53.

ELLIS, M. B. Dematiaceae Hyphomycetes. VII. Curvularia, Brachysporum etc. Commonwealth Mycological Institute, **Mycological Papers**, n 106, England. 57 p, 1966.

FAO, 2017. **Statistical Dates**. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data> acesso em:20/01/2019.

FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiologia Plantarum** 119: 355-364. 2003.

FREIRE, M.M. **Composição e atividade antifúngica do óleo essencial de hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.)**. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais. 67p, 2006.

FURTADO, D. C. **Efeito de óleos essenciais e extratos vegetais no controle de *fusarium semitectum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Curvularia luneta* e *C. eraglostidis* em inflorescências de *tapeinochillus anannaceae***. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Alagoas. Rio Largo. 61p, 2006.

FURTUNATO, A. A. **Estudo da cinética de inativação térmica da pectina esterase e peroxidase presente na polpa de cajá (*Spondias lútea*)**. Rio Grande do Norte. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). 74p. 2002.

GISI, U.; SIEROTZKI, H. Fungicide modes of action and resistance in downy mildews. **European Journal of Plant Pathology**, v. 122, n. 1, p. 157–167, 2008.

HABER, L.L. et al. **Diferentes concentrações de solução nutritiva para o cultivo de *Mentha Piperita* e *Melissa Officinalis***. Horticultura Brasileira, 23(4): 1006-1009 2005.

HAMMER, S. R. Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? **Physiological Molecular Plant Pathology**, New York, v.55, p.77-84, 1999.
b

HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. G. Responses to plant pathogens. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (Ed.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiology, 2000. p. 1102-1156.

HARMAN, G. E. Trichoderma species – opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature**, v. 2, p. 43-56, 2004a.

HARMAN, G.E. Mythos and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derive from research on *Trichoderma harzianum* T22. **Plant Disease**. 84:377-393. 2004b.

HEINZMANN, B.M. Compostos com enxofre. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS, 2001. p.633-650.

INFANTE, D. et al. Mecanismos de acción de Trichoderma frente a hongos Fitopatógenos. **Rev. Protección Veg.** Vol. 24 No. 1 (2009):

INMET, 2018. Instituto Nacional de Meteorologia. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=bdmep/bdmep>. Acesso em: 26/12/2018.

ITAKO, A.T. **Óleo essencial de *Cymbopogon citratus*: atividade antifúngica em alternaria solani e ativação de mecanismos de defesa em tomateiro.** Dissertação (Mestre em Agronomia: Proteção de plantas) Universidade Estadual de Maringá. p. 64. 2008.

KIMATI, H. et al. **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas.** 4. Ed. São Paulo: Agronômica Ceres. P.415-419, 2005.

KUHN, O.J. et al. Efeito do extrato aquoso de cúrcuma (*Curcuma longa*) em *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis*. **Semina Ciências Agrárias**, v. 27, n.1, p.13-20, 2006.

KUHN, O.J.; PASCHOLATI, S.F. Custo adaptativo da indução de resistência em feijoeiro mediada pela rizobactéria *Bacillus cereus* ou acibenzolar-S-metil: atividade de enzimas, síntese de fenóis e lignina e biomassa. *Summa Phytopathologica*, v.36, n.2, p.107-114, 2010.

LARANJEIRA, D. Situação atual do controle biológico de *Fusarium* spp. In: VII Reunião de controle Biológico de Fitopatógenos. Bento Gonçalves. **Anais. Bento Gonçalves: UFSM e EMBRAPA Uva e Vinho**, 2001.

LISZKAY, A.; VAN DER ZALM, E.; SCHOPFER, P. Production of reactive oxygen intermediates (O²(center dot-), H₂O₂, and (OH)-O-center dot) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. **Plant Physiology** 136: 3114-3123. 2004.

LO, L.C. et al. Phytoalexin accumulation in sorghum: identification of a methyl ether of luteolinidin. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 49:21-31. 1996.

LOPES, R. B. A indústria no controle biológico: produção e comercialização de microrganismos no Brasil In: Bettiol W, Morandi MAB (Eds.) Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. **Embrapa Meio Ambiente**. p 15-28, 2009.

LORENZETTI, E. et al. Indução de resistência à *Macrophomina phaseolina* em soja tratada com extrato de alecrim. **Summa Phytopathologica**, v.44, n.1, p. 45-50, 2018.

MAIA, Aline José et al. Óleo essencial de alecrim no controle de doenças e na indução de resistência em videira. **Pesq. agropec. bras.** [online]. 2014, vol.49, n.5, pp.330-339.

MELO, I. S. Trichoderma e Gliocladium como bioprotetores de plantas. **Revis. Anu. Patol. Plantas** v. 4, p. 261-295. 1996.

MELO, I. S. Agentes microbianos de contro le de fungos fitopatogénicos. (Eds.) **Controle biológico. Jaguariúna: EMBRAPA**, 1998.

MESQUITA, A.S. Inhame *Dioscorea cayennensis* Lam. e taro *Colocassia esculenta*(L) Schott-Cenários dos mercados brasileiros e internacional. In: Anais. II Simpósio Nacional sobre as culturas do inhame e taro. II SINCIT, João Pessoa, Paraíba, v.1, p. 215-238, 2002.

MICHEREFF, S. J.; MAFFIA, L. A.; NORONHA, M. A. Progresso e arranjo espacial da queima das folhas do inhame, causadas por *Curvularia eragrostidis*, na Zona da mata de Pernambuco **Agrotropica, Ilhéus**, v.12, n. 2, p. 87-94, 2000.

MORAES, L.A.S. Influencia dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v.27, p.4050 – 4063, 2009.

MOURA, R.M. Doenças do inhame–da–costa (*Dioscorea cayennensis*). In: Kimati, H., Amorim, L., Rezende, J.A.M., Bergamin Filho, A. & Camargo, L.E.A. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4ª ed. v. 2. São Paulo. Agronômica Ceres. 2005. p. 415–419.

MOURA, R.M. Principais doenças do inhame-da-costa no Nordeste do Brasil. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, v. 3, p.180-199, 2006.

MOLLER, I. M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 52, p. 561-591, Sept. 2001.

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

MONTEIRO, V. N. et al. New insights in *Trichoderma harzianum* antagonismo fungal plant pathogens by secreted protein analysis. **Curr Microbiol**, v. 61, n. 4, p. 298-305, Out 2010.

NAKAZAWA, A.; NOZUE, M.; YASUDA, H. Expression pattern and gene structure of phenylalanine ammonia-lyase in *Pharbitis nil*. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 114, n. 2, p. 323-328, Apr. 2001.

NETO, P. A. S. P. et al. INHAME: O Nordeste fértil. Maceió: **EDUFAL**. p. 28-29, 2000.

NOBRE, S. **A força da cultura do inhame em Alagoas**. Disponível em: <http://www.sebrae.com.br/uf/alagoas/areas-de-atuacao/agronegocios/cultura-do-inhame/integra_bia/ident_unico/4140>. Acessado em: 26/12/2018.

OLIVEIRA, M. M. M. et al. Rendimento, composição química e atividade antilisterial de óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n. 1, p. 8-16, out. 2011.

OLIVEIRA, M.E.F.S. **Controle alternativo da queima das folhas (*Curvularia aeragrostidis*) (HENN.) Meyer do Inhame**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Alagoas. Rio Largo. 57p, 2014.

PASSARDI, F.; PENEL, C.; DUNAND, C. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. **Trends in Plant Science** 9: 534-540. 2004.

PASTRANA, A.M. et al. Biological control of strawberry soil-borne pathogens *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium solani*, using *Trichoderma asperellum* and *Bacillus* spp. **Phytopathologia Mediterranea**, Spain, 2016.

PEIXINHO, G.S.; RIBEIRO, V.G.; AMORIM, E.P.R. Ação do óleo essencial de menta (*Mentha arvensis*) sobre o patógeno *Lasiodiplodia theobromae* em cachos de videira cv. Itália. **Summa Phytopathologica**, v.43, n.1, p.32-35, 2017.

PENTEADO, S.R. **Defensivos alternativos e naturais: para uma agricultura saudável**. Campinas, 1999. 79 p.

PEREIRA, S.C. et al. Efeito da aplicação foliar de silício na resistência à ferrugem e na potencialização da atividade de enzimas de defesa em cafeeiro. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, n. 4, p. 223–230, 2009.

PINHEIRO, M.M. et al. A defesa das plantas contra as doenças. **Ciências hoje**, 1999. 147:1-11.

RESENDE, M. L. V. et al. Perspectivas da indução de resistência em cacauzeiros contra *Crinipellis pernicioso* através do benzotriazolole (BTH). **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, n. 2, p. 149-156, Brasília. 2000.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 123-130, jan./fev. 2003.

RESENDE, M. L. V. et al. Induction of resistance against *Phoma costarricensis* on coffee leaves by extracts from citrus pulp and coffee leaves and husks. In: **The international joint workshop on pr-proteins and Induced resistance**, Helsingor: IJW, 2004. p. 79.

RESENDE, M. L. V. et al. Seleção de extratos vegetais para indução de resistência e ativação de respostas de defesa em cacauzeiro contra a vassoura-de-bruxa. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 3, p. 213-221, maio/jun. 2007.

ROMERO, A. L. et al. Efeito de monoterpenos naturais no crescimento micelial e germinação de conídios de *Corynespora cassiicola*. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, v. 18, n. 1, p. 3–7, 2013.

SALES, M. E. **Avaliação de produtos naturais no controle da Queima das folhas do Inhamé (*Curvularia eragrostidis* (Henn.) Meyer)**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Alagoas. Rio Largo. 61p, 2014.

SANDES, W. A. S. **APL Inhamé no Vale do Paraíba**. Disponível em: <www.seplande.al.gov.br/desenvolvimento-economico/desenvolvimento-regional-esetorial/13-arranjos-1/inhamé-no-vale-do-paraiba>. Acesso: 04/02/2019

SANTOS, C. O. **Óleo essencial de *Mentha piperita* L.: uma breve revisão de literatura**. p. 20. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) Universidade Estadual da Paraíba. p 20. 2011.

SANTOS, E.S. Inhame (*Dioscorea* spp.): aspectos básicos da cultura. **EMEPA-PB, SEBRAE**, 1996.158 p.

SANTOS, E. S. et al. INHAME (*Dioscorea* sp.) Tecnologias de produção e preservação ambiental. **Tecnologia & Ciências Agropecuárias**, Joao Pessoa. v. 1, n. 1, p. 31-36, set. 2007.

SANTOS, E.S.; MACEDO, L.S. Tendências e perspectivas da cultura do inhame (*Dioscorea* sp.) no Nordeste do Brasil. Anais, 2º Simpósio Nacional sobre as Culturas do Inhame e do Taro, João Pessoa, PB. 2002. v.1, p. 21-31.

SANTOS, M.B. e et al. Efeito inibitório in vitro de extrato vegetal de *Alliums ativum* sobre *Aspergillus niger* Tiegh. **Revista Brasileira de plantas Mediciniais** vol.12 no.1 Botucatu Jan./Mar. 2010.

SANTOS, M.Q.C. **Caracterização morfofisiológica e molecular de *Pythium cucurbitacearum*, e controle alternativo da podridão do colo e das raízes do mamoeiro**. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Alagoas. P. 96, 2015.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; J.R. STANGARLIN, CRUZ, M.E. S. Uso de plantas medicinais no controle de doenças de plantas. **Fitopatologia Brasileira**,28: 54-56, Suplemento. 2003.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R; PASCHOLATI, S.F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal In: PASCHOLATI, S.F. **(Org) Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular Piracicaba: FEALQ**, 2008.p227-248.

SEPLANDE. **APL Inhame Vale do Paraíba**. 2012. Disponível em: www.seplande.al.gov.br. Acessado em: 12/12/2018.

SINGH, H. N. P.; Prasad, M. M.; Sinha, K. K. Efficacy of leaf extracts of some medicinal plants against disease delve lop ment in banana. **Letters in Applied Microbiology**, v.17, n.6, p.269-271, 1993.

SHIGEOKA, S. et al. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. **Journal of Experimental Botany** 53: 1305-1319. 2002.

SILVA, J.C. **Uso de óleos essenciais, extratos vegetais e indutores de resistência no controle alternativo do mal-do-Panamá da bananeira**. Dissertação (Mestrado em

agronomia: produção vegetal) Universidade Federal de Alagoas. Centro de ciências agrárias, Rio Largo 2007.

SILVA, M. C.; GUERRA-GUIMARÃES, L.; NICOLE, M. Cytological and biochemical mechanisms involved in coffee leaf rust resistance. In: ZAMBOLIM, L.; ZAMBOLIM, E.; VÁRZEA, V. M. P. (Ed.). *Durable resistance to coffee leaf rust*. Viçosa, MG: UFV, 2005. p. 249-283.

SILVA, M. C. et al. Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 18, n. 1, p. 119-147, 2006.

SPIEGEL, Y.; CHET, I. Evolution of *Trichoderma* spp. as a biocontrol agent againsts oil borne fungi and plant parasitic nematodes in Israel. **Integrated Pest Management Review**, v. 03, p. 167-175, 1998.

STANGANLIN, J.R. et al. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**. Volume 10, n 1. 2011, p 1846.

TROIAN, R. F. **Análise do secretoma da interação entre *Trichoderma harzianum* e os estágios de desenvolvimento do fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum***. Tese (Doutorado em Ciências: biologia molecular) Universidade de Brasília (UnB). p. 82, 2014.

TSENG, SHIH-CHI et al. Proteomic Study of Biocontrol Mechanisms of *Trichoderma harzianum* ETS 323 in Response to *Rhizoctonia solani*. **J. Agric.Food Chem.** v. 56, n.16, p. 6914-6922, 2008.

VALDERRAMA. P.; MARANGONI, F.; CLEMENTE, E. Efeito do tratamento térmico sobre a atividade de peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) em maçã (*Mallus comunis*) **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 2, n. 3, p. 321-325, 2001.

VERPOORTE, R.; MARASCHIN, M. **Engenharia do metabolismo de plantas medicinais**. In: Nunes, R.A.; Calixto, J.B. (Orgs.):Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó: Argos, 2001. p.381-432.

VINALE F. et al. *Trichoderma*–plant pathogen interactions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, p.1-10.2008.