Revista Varia Scientia Agrárias
v. 03, n.02, p. 135-145

Ano de Impressão 2013

PRODUÇÃO VEGETAL

CARACTERIZAÇÃO E CONTROLE ALTERNATIVO DE *DIPLOCARPON ROSAE*

Mathias Isenberg 1,
Marcia de Holanda Nozaki 2

RESUMO: A mancha de *Diplocarpon* das roseiras é uma doença fúngica causada pelo patógeno *Diplocarpon rosae* e é reconhecida pelas manchas pretas encontradas na parte adaxial das folhas. Em ataques severos causa desfolhamento das roseiras, o que é prejudicial para a produção de rosas de boa qualidade. Este trabalho foi conduzido com o objetivo de estudar o crescimento e desenvolvimento de *D. rosae* sob meios de cultura e na presença de diferentes concentrações de óleo essencial de alfavaca (*Ocimum basilicum*). O experimento foi conduzido no laboratório de Microbiologia da PUCPR, *Campus* Toledo. Foi realizado um ensaio com diferentes meios de cultura, sendo: Agar-Água, BDA, agar-aveia, agar-pétalas de rosas e agar-folhas de roseira. Além deste, realizou-se um ensaio para verificar a inibição de crescimento micelial e produção de esporos, o qual foi constituído de sete tratamentos, sendo: óleo essencial de Alfavaca nas concentrações de 0; 2,5; 5; 10; 25; 50 e 100µL aplicados sobre o meio de cultura batata-dextrose-ágar. O meio de cultura que apresentou maior crescimento micelial de *D. rosae* foi o meio contendo folhas de roseira que diferiu estatisticamente dos demais meios de cultura. O óleo essencial de *Ocimum basilicum* inibiu o crescimento micelial e produção de esporos de *D. rosae* nas concentrações acima de 10µL, enquanto as concentrações de 2,5µL e 5µL inibiram o patógeno de forma parcial.

Data de submissão 07-06-2012
Data de aceite: 30-10-2012

1 Eng. Agrônomo; formado pela Pontifícia Universidade Católica do Paraná, campus Toledo. Profissional autônomo.
2 Profa Dra. Adjunta - Curso de Agronomia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Departamento de Fitossanidade, campus Toledo. E.mail: marcia.nozaki@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: Pinta preta. Roseira. Óleo essencial. *Ocimum basilicum*.

ABSTRACT: The black spot of roses is a fungal disease caused by *Diplocarpon rosae* and it is recognized by the black spots found on the lower parts of leaves. In severe attacks the black spot causes defoliation on roses, which is prejudicial for a good quality in the roses production. The present work was conduced with the objective to study the growth and development of *D. rosae* under different growth media and the presence of different *Ocimum basilicum*'s essential oil concentration. The experiment was conduced in the Microbiology Laboratory of the Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Toledo campi. An assay was conducted with different culture media, such as: water-agar, Potato-dextrose-agar, oat-agar, rose petal-agar and rose leaves-agar. Furthermore, an assay was carried out to verify the inhibition of mycelial growth and spores production, which was constituted by seven treatments: Ocimum essential oil in the concentrations of 0; 2.5; 5; 10; 25; 50 and 100µL applied over the potato-dextrose-agar culture media. The culture media that presented bigger micelial growth of *D. rosae* was the one containing rose leaves that differed statistically from the other culture media. The *Ocimum basilicum* essential oil inhibited the *D. rosae* spores production on the concentrations above 10µL while the concentrations of 2.5 and 5µL inhibited partially the pathogen.

KEYWORDS: Black spot. Rose. Essential oil. *Ocimum basilicum*.

INTRODUÇÃO

Na floricultura, a participação do Brasil nas exportações internacionais é de apenas 0,22% o que representa 3% do faturamento do setor. O desempenho nas duas últimas décadas tem sido bastante satisfatório, com taxa de crescimento de 20% ao ano (PEREIRA; MELO; DIAS, 2006).

Os principais estados produtores de flores são os Estados de São Paulo (70% da produção), Minas Gerais, Rio de Janeiro, Alagoas, Pernambuco, Bahia, Ceará, Rio Grande do Sul e Santa Catarina (PEREIRA; MELO; DIAS, 2006).

Um dos problemas da floricultura é a ocorrência de doenças, que diminuem a qualidade e quantidade de flores produzidas, aumentando assim os gastos dos produtores no controle dessas (BARBIERI e STUMPF, 2005).

A pinta preta das roseiras é uma doença que pode, de maneira direta, diminuir a qualidade e quantidade de rosas produzidas por uma roseira. Atualmente são utilizados dois métodos para controlar essa doença: controle preventivo (eliminando restos culturais, diminuindo irrigação, aumentando espaçamento entre plantas, etc.) e controle

curativo, que basicamente constitui-se no uso de fungicidas (com ingredientes ativos, tais como: clorotalonil, captana, cresoxim-metílico, oxicloreto de cobre, mancozebe, dentre outros) ou calda bordalesa (CIVITA, 1977; GOOLD, 1998).

A conservação do meio ambiente é uma das principais preocupações existentes entre os seres humanos. Uma prática agrícola que é considerada prejudicial ao meio ambiente e que é largamente usada, é o uso de agrotóxicos, sejam eles inseticidas, fungicidas, herbicidas, acaricidas, etc. (MMA, 2005).

O estudo e adoção de controles alternativos no combate a doenças fúngicas vêm se mostrando necessário nos dias de hoje, principalmente devido ao uso irresponsável e demasiado de produtos químicos, os quais além de aumentar o custo de produção, são altamente prejudiciais a qualquer forma de vida existente no planeta (RAZWALKA, 2003).

Com base no exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do óleo essencial de Alfavaca (*Ocimum basilicum)* sobre o crescimento e reprodução do fungo *Diplocarpon rosae* em diferentes meios de cultura.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado No laboratório de Microbiologia, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Toledo, PR.

O óleo essencial de alfavaca foi extraído pelo método de arraste de vapor d'água descrito por Simões et al. (2004), com auxílio do aparelho de Clevenger adaptado. Para a extração do óleo essencial foram utilizadas folhas frescas (colhidas no dia da extração). As folhas, aproximadamente 60g de peso fresco, foram depositadas no interior de um balão volumétrico, contendo aproximadamente 600 mL de água. A água foi aquecida com auxílio de uma manta térmica até atingir a temperatura de 90 °C. Após, foram mantidas nesta temperatura por um período de três horas, correspondente ao tempo de extração.

O óleo obtido foi coletado em vidro âmbar com auxílio de uma pipeta, e posteriormente armazenado em geladeira a 6 °C.

Para obtenção do isolado de *Diplocarpon rosae*, agente causal da pinta preta, folhas sintomáticas de roseira (*Rosa* spp.) foram coletadas de cultivo doméstico na região Oeste do Paraná, das quais foram retirados pequenos fragmentos do tecido doente com auxílio de lâmina de corte. Posteriormente, os fragmentos de folha foram submetidos a

uma desinfecção prévia em solução de hipoclorito de sódio (3:1) por 3 minutos, seguida de Álcool 70% por 1 minuto, visando à remoção de saprófitos. Em seguida, realizou-se a transferência de forma asséptica dos fragmentos foliares para placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA: 200g de batata, 20g de dextrose e 20g de ágar). As placas foram mantidas em estufa para B.O.D. por um período de 10 dias. Após esse período, discos de 5,0 mm de diâmetro de micélio do isolado foram transferidos para o centro de placas de Petri contendo meios BDA, e estas mantidas a 25 ± 2 °C e fotoperíodo alternado até o momento de utilização nos respectivos ensaios.

EFEITO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA SOB O CRESCIMENTO MICELIAL DE *Diplocarpon rosae*

O delineamento experimental adotado para o ensaio de crescimento micelial em diferentes meios de cultura foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e seis repetições cada. Os tratamentos foram: BDA (200g de batata, 20g de dextrose e 20g de ágar), Ágar-Aveia (80g de aveia, 20g de ágar), Ágar-Folhas (20g de folhas de roseira trituradas, 25g de dextrose e 20g de ágar), Ágar-Pétalas (20g de pétalas de rosa trituradas, 25g de dextrose e 20g de ágar) e Ágar - Água (20g de ágar), concentrações estas para o preparo de 1L de meio de cultura.

Os meios de cultura foram devidamente autoclavados (121°C/ 20min) e transferidos para placas de Petri de 7 cm de diâmetro.

Após a solidificação do meio, foram depositados discos miceliais de aproximadamente 5 mm de diâmetro obtidos de colônias puras do fungo, com 20 dias de cultivo no centro de cada placa. Os discos miceliais foram realizados com auxílio de um vazador de metal.

As placas foram mantidas sob fotoperíodo alternado (12 horas de luz/12 horas escuro) e temperatura ambiente de 25 °C ± 5 °C durante o período de avaliação.

As avaliações de crescimento micelial da colônia foram realizadas diariamente com auxílio de uma régua graduada de 30 cm. As medições foram realizadas nos sentidos diametricamente opostos das placas de Petri, até que em algum dos tratamentos, a colônia completasse todo diâmetro da placa.

Para os dados que não apresentaram distribuição normal dos erros foram feitas as transformações de acordo com Banzatto e Kronka (2008). Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística

utilizando a comparação de médias através do teste de Tukey a 5% de probabilidade.

EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE ALFAVACA SOB O CRESCIMENTO E ESPORULAÇÃO DE *Diplocarpon rosae*.

O delineamento experimental adotado para o ensaio de crescimento micelial sob diferentes concentrações de óleo essencial de alfavaca foi inteiramente casualizado, com sete tratamentos, sendo estes: Testemunha, sem adição de óleo essencial; 2,5; 5; 10; 25; 50 e 100 μL de óleo, constituídos de sete repetições cada.

Os óleos nas diferentes concentrações foram depositados e espalhados sobre a superfície do meio de cultura BDA com auxílio da alça de Drigalsky. Após a deposição do óleo essencial, um disco micelial de 5 mm de diâmetro obtidos de colônias puras do fungo com 20 dias de cultivo foi depositado no centro de cada placa. Os discos miceliais foram obtidos com auxílio de um vazador de metal.

As placas foram mantidas sob fotoperíodo alternado (12 horas de luz/12 horas escuro) e temperatura ambiente de 25 °C ± 5 °C durante o período de avaliação (18 dias).

Para determinar o número de esporos, ao término da avaliação do crescimento micelial de *Diplocarpon rosae* foi realizado o preparo de uma solução de esporos para cada tratamento.

A solução de esporos foi obtida através do acréscimo de 10 mL de água esterilizada em cada placa, realizando-se uma raspagem superficial do meio com a colônia fúngica, com auxílio de uma espátula de metal, separando o micélio do meio de cultura para liberação dos esporos do fungo. Com auxílio de um funil de vidro, a solução de esporos foi filtrada em gaze sendo retida em um béquer de 100 mL. Posteriormente, procedeu-se a coleta de 1 mL desta solução, o qual foi depositado sobre a câmara de Neubauer (hemacitômetro) para contagem do número de esporos produzidos pelo fungo em cada tratamento.

Para os dados que não apresentaram distribuição normal dos erros foram feitas as transformações de acordo com Banzatto e Kronka (2008).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e quando significativos, submetidos à análise de regressão polinomial utilizando o software R-2.8.1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

EFEITO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA SOB O CRESCIMENTO MICELIAL DE *Diplocarpon rosae.*

Os resultados da avaliação de crescimento micelial de *Diplocarpon rosae* sob diferentes meios de cultura podem ser observados na Tabela 1.

Pode-se observar pela média dos dias de avaliação, que os meios de cultura diferiram estaticamente da média de crescimento micelial, onde o meio contendo folhas de roseira obteve maior crescimento micelial seguido pelo meio contendo pétalas, meio BDA, meio Agar-Água e por último o meio de cultura contendo aveia.

Tabela 1. Média de crescimento micelial (cm) de *Diplocarpon rosae* submetido a diferentes meios de cultura, aos 11 dias após implantação do ensaio.

Tratamentos	**MEDIA (cm)**	
Ágar-Aveia	6.2	a
Ágar-Pétalas	6.8	c
Ágar - Água	6.2	a
Batata-dextrose-ágar	6.6	b
Ágar-Folhas	7.0	c
CV (%)	1.83	

* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.
CV = coeficiente de variação

A avaliação do crescimento micelial foi finalizada após 11 dias da implantação do ensaio, tendo o tratamento contendo meio de cultura com folhas de roseira, neste período, completado todo o diâmetro da placa, em todas as suas repetições.

Quando apenas os meios BDA e Ágar-Água são comparados, o resultado se assemelha ao encontrado por Gachomo (2005), que testou o crescimento micelial de *Diplocarpon rosae* sob quatro meios de cultura; BDA, Ágar-Água, Extrato de malte e Biomalte, e observou que o meio BDA apresentou o maior crescimento micelial.

Assim como observado no presente trabalho, ao utilizar pétalas de rosa (Ágar-Pétalas) houve uma media de crescimento expressivo do patógeno (6,8 cm) ao término das avaliações. Resultados semelhantes foram obtidos por Montarroyos et al. (2007). Estes autores observaram

maior crescimento micelial de *Mycosphaerella musicola* (Sigatoka em bananeira) ao utilizarem meios de cultura contendo folhas de bananeira, sugerindo possivelmente que ao conter em sua composição elementos da planta hospedeira, há um ambiente mais propício para o desenvolvimento do patógeno.

EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE ALFAVACA SOB O CRESCIMENTO E ESPORULAÇÃO DE *Diplocarpon rosae*.

Os resultados da avaliação de crescimento micelial de *Diplocarpon rosae* sob diferentes concentrações de óleo essencial de *Ocimum basilicum* podem ser observados na Figura 1. A avaliação do crescimento micelial foi finalizada após 18 dias da implantação do ensaio, tendo o tratamento testemunha neste período completado todo o diâmetro da placa em todas suas repetições.

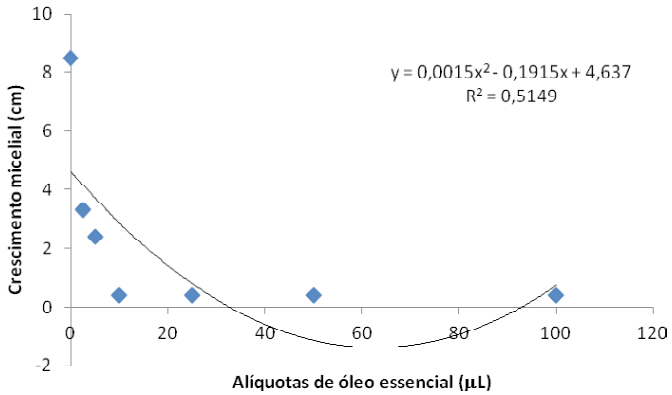

Figura 1. Efeito de diferentes alíquotas de óleo essencial de *Ocimum basilicum* no crescimento micelial (mm) de *Diplocarpon rosae* aos 18 dias após implantação do ensaio.

Observa-se uma inibição praticamente total do crescimento micelial de *Diplocarpon rosae* nas alíquotas de 10; 25; 50 e 100 µL (Figura 1). Enquanto os tratamentos de 2,5 µL e 5 µL apresentaram crescimento micelial relativo de *Diplocarpon rosae*, diferindo assim, como nas demais concentrações de óleo, significativamente da testemunha (sem adição de óleo essencial).

Resultados semelhantes foram encontrados por Pereira; Melo;

Dias (2006) que obtiveram controle de *Aspergillus ochraceus, Aspergillus niger e Aspergillus flavus* a partir da concentração de 1000 $mg.ml^{-1}$ de óleo essencial de alfavaca.

Razwalka (2003) observou que ao utilizar óleo essencial de Alfavaca no controle de *Glomerella cingulata* (Antracnose em frutos de goiabeira) na concentração de 10 µL houve inibição de 25% do crescimento micelial do patógeno *G. cingulata*. Estes resultados estão de acordo com os resultados ora apresentados, tendo em vista que o óleo essencial de *O. basilicum* no presente estudo inibiu *D. rosae* na concentração de 10 µL.

Entretanto, resultados diferentes dos obtidos no presente trabalho foram relatados em trabalhos realizados por Souza Junior; Sales; Martins (2009) no qual os mesmos observaram que a partir da concentração de 1 ìL/mL, os óleos essenciais de todas as espécies vegetais testadas (*Lippia sidoide*s, *Ocimum gratissimum*, *Lippia citriodora*, *Cymbopogon citratus* e *Psidium guayava* var. *pomifera*) apresentaram efeito sobre a germinação dos conídios, com inibição de 100% de *Colletotrichum gloeosporioides* do maracujazeiro amarelo.

Em trabalhos desenvolvidos por Benini et al. (2010) para verificar o efeito do óleo essencial e do extrato bruto de alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum)* no crescimento micelial *in vitro* dos fungos *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Phytophthora* sp. e *Alternaria alternata,* observaram inibição total do crescimento micelial dos fungos nas diferentes alíquotas de óleo essencial. Estes resultados demonstram comportamento diferente dos apresentados no presente trabalho, tendo em vista que nas concentrações de 2,5 e 5 ìL ainda houve crescimento fúngico.

Com relação à contagem de esporos de *D. rosae,* houve resultados semelhantes aos obtidos no ensaio de crescimento micelial, sendo que acima de 10 µL de óleo essencial de *O. basilicum* não foi constatada a presença de esporos, considerando assim um controle efetivo com relação a produção de esporos do fungo (Figura 2).

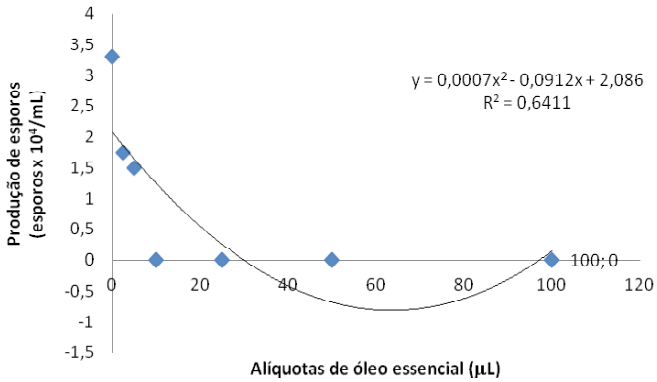

Figura 2. Efeito de diferentes alíquotas de óleo essencial de *Ocimum basilicum* sobre a produção de esporos de *Diplocarpon rosae* (esporos x 10^4/mL).

Todos os tratamentos diferiram significativamente da testemunha, considerando, entretanto, para um efetivo controle do patógeno o uso de óleo essencial de alfavaca em concentrações superiores a 10 µL.

O resultado obtido se assemelha com o obtido por Deepak et al. (2007), que obtiveram controle na esporulação de *Aspergillus sp.*, *Botrytis fabae*, *Colletotrichum musae*, *Fusarium proliferatum*, *Geotrichum candidum*, *Botryosphaeria rhodina*, *Trichoderma sp.* e *Verticillium fungicola* utilizando extrato foliar de *Ocimum basilicum* (diluição 1:99).

Pereira et al. (2006) ao avaliar os efeitos inibitórios, "in vitro", de óleos essenciais de condimentos (*Rosmarinus officinalis* L., *Allium cepa* L., manjericão *Ocimum basilicum* L., *Mentha piperita* L. e *Origanum vulgare* L., sobre o desenvolvimento de fungos *(Fusarium* sp.; *Aspergillus ochraceus* Wilhelm.; *Aspergillus flavus* Link e *Aspergillus Níger)* observaram que os óleos de forma geral apresentaram efeito pronunciado a partir da concentração de 1500 mg/mL^{-1}. Resultados estes semelhantes aos obtidos no presente experimento, no qual concentrações acima de 10 µL geraram maior controle do fungo em estudo.

Resultados divergentes aos do presente estudo foram obtidos por Olanda et al. (2012), os quais ao testarem a atividade fungitóxica de 35 óleos essenciais de plantas sobre *Colletotrichum lindemuthianum* não observaram controle algum deste com o óleo de *Ocimum basilicum* L., o mesmo testado no presente trabalho.

CONCLUSÃO

O óleo essencial de alfavaca em concentrações acima de 10 µL mostrou-se eficiente quanto ao controle *in vitro* de pinta preta sendo necessário, entretanto mais testes para seu uso como uma alternativa de controle a campo.

Observou-se que meios de cultura contendo partes de roseira apresentam melhores médias de crescimento micelial, podendo vir a ser uma alternativa em estudos futuros concernentes à caracterização do patógeno.

REFERÊNCIAS

BARBIERI, R. L.; STUMPF, E. R.T. Origem, Evolução e História das rosas cultivadas**.** 2004. **Revista Brasileira Agrociência**, Pelotas, v.11, n. 3, jul-set, 2005, p. 267-271.

BENINI, P.C.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; KLAIS, E.C.; CRUZ, M.E.S.; ITAKO, A.T.; MESQUINI, R.M.; STANGARLIN, J.R.; TOLENTINO JUNIOR, J.B. Efeito *in vitro* do óleo essencial e extrato aquoso de *Ocimum gratissimum* colhido nas quatro estações do ano sobre fitopatógenos. **Arq. Inst. Biol**., São Paulo, v.77, n.4, p.677-683, out./dez., 2010.

CIVITA, V. **Rosas**: Guia prático com tudo o que você precisa saber para cultivar as mais belas rosas. 1ª ed., São Paulo: Editora Abril., 1977, p. 4-12.

DEEPAK, S.A.; OROS, G.; SATHYANARAYANA, S.G.; SHEKAR-SHETTY, H.; SASHIKANTH, S. Antisporulant Activity of Watery Extracts of Plants against *Sclerospora graminicola* Causing Downy Mildew Disease of Pearl Millet. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences,** New York, n.2, 2007, p.36-42.

DINIZ, S.P.S.S.; COELHO, J.S.; ROSA, G.S.; SPECIAN, V.; OLIVEIRA, R.C.; OLIVEIRA, R.R. Bioatividade do óleo essencial de *Mentha arvensis L.* no controle de fungos fitopatológicos. **Revista brasileira de plantas medicinais.**, Botucatu, v. 10, n. 4, 2008, p. 9-11.

GACHOMO, E.W. **Studies of the *Diplocarpon rosae* Wolf on roses and the effectiveness of fungicides on pathogenesis**. Dissertation – Agronomy, Rheinishcen Friedrich Wilhelms Universitat, Cuvillier Verlag – Goettingen, 2005

GOOLD, A.; **Um Manual de Jardinagem**: Rosas. 1ª ed., São Paulo: Editora Malone., 1998, p. 6-9.

MMA – Ministério do meio ambiente e agricultura. 2005. **Manual de impactos ambientais:** Orientações básicas sobre aspectos ambientais de atividades produtivas. Disponível em: http://www.mma.gov.br/estruturas/sqa_pnla/_arquivos/manual_bnb.pdf. Acesso em: 28.ago.2011.

MONTARROYOS, A.V.; COELHO, R.S.B.; FERRAZ, G.M.G.; SANTOS, R.; SANTOS, V.F.; ANDRADE, P.P. Efeitos de meios de cultura, fontes de carbono e nitrogênio, pH e regime luminoso no crescimento de *Mycosphaerella musicola*. **Summa Phytopathologyc.**, Botucatu, v.33, n. 1, 2007, p. 86-89.

OLANDA, G.B.; SANTIAGO, M.F.; ANTUNES, I.F.; BEVILAQUA, G.A.P.; FARIA, C.R.J. Atividade fungitóxica de 35 óleos essenciais de plantas sobre *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Briosi & Cavara isolado de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). 2012. Disponível em: http://www.ufpel.edu.br/enpos/2012/anais/pdf/CA/CA_00531.pdf. Acesso em: 28.out.2012.

PEREIRA, C.M.M.A.; MELO, M.R.; DIAS, P.B. Cadeia de produção de rosas na região de Barbacena, estado de Minas Gerais. **Informações Econômicas**. São Paulo, v.36, n. 7, jul., 2006, p. 22-31.

PEREIRA, M.C.; VILELA, G.R.; COSTA, L.M.A.S.; SILVA, R.F.da; FERNANDES, A.F.; FONSECA, E.W.N. da; PICCOLI, R.H. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. Ciênc. agrotec., Lavras, v. 30, n. 4, p. 731-738, jul./ago., 2006.

RAZWALKA, L.C. **Controle alternativo da antracnose em frutos de goiabeira, em laboratório**. Dissertação – Agronomia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003, p. 27-35.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; **Farmacognosia:** Da planta ao medicamento. 5ª ed., Porto Alegre: Editora UFRGS., 2004, p. 466-476.

SOUZA JUNIOR, I.T.; SALES, N.L.P.; MARTINS, E. R. Efeito fungitóxico de óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides,* isolado do maracujazeiro amarelo. Revista Biotemas, 22 (3), setembro de 2009. p.78-83.