

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

JANAINA MIYASHIRO SIMON

Extratos vegetais e produtos comerciais no controle de *Diplocarpon rosae* e na indução de resistência em roseiras

Maringá
2016

JANAINA MIYASHIRO SIMON

Extratos vegetais e produtos comerciais no controle de *Diplocarpon rosae* e na indução de resistência em roseiras

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

Área de concentração: Proteção de Plantas

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

Maringá
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

S595e Simon, Janaina Miyashiro
Extratos vegetais e produtos comerciais no controle de *Diplocarpon rosae* e na indução de resistência em roseiras / Janaina Miyashiro Simon. - Maringá, 2016.
ix, 54 f. : il. color., figs., tabs.

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

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2016.

1. Rosas de corte - Pinta preta - Controle alternativo. 2. *Diplocarpon rosae* - Pinta preta. 3. Rosas de corte - Produtos naturais - Extratos vegetais. 4. Extratos vegetais - Atividade antifúngica. I. Schwan-Estrada, Kátia Regina Freitas, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Agronomia. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

CDD 21.ed. 635.933734

AMMA-003059

JANAINA MIYASHIRO SIMON

Extratos vegetais e produtos comerciais no controle de *Diplocarpon rosae* e na indução de resistência em roseiras

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agronomia pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof^a Dr^a Adriana Terumi Itako
Universidade Federal de Santa Catarina - Curitibanos

Prof. Dr. Arney Eduardo do Amaral Ecker
Universidade Estadual de Maringá

Prof^a Dr^a Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada
Universidade Estadual de Maringá (Orientadora)

Aprovada em 24 de Fevereiro de 2016.

Local de defesa: Bloco J-45, anfiteatro II, *campus* da Universidade Estadual de Maringá, às 8h.

JANAINA MIYASHIRO SIMON

**EXTRATOS VEGETAIS E PRODUTOS COMERCIAIS NO CONTROLE DE
Diplocarpon rosae E NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM ROSEIRAS**

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

APROVADA em 24 de fevereiro de 2016.

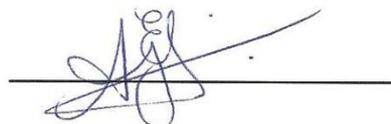
Prof.^a Dr.^a Kátia Regina Freitas Schwan Estrada
Presidente



Prof.^a Dr.^a Adriana Terumi Itako
Membro



Prof. Dr. Arney Eduardo do Amaral Ecker
Membro



DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho
aos meus pais, que não
mediram esforços para com
que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela sabedoria, saúde, força e proteção.

Agradeço a minha família, meu pai Francisco e minha mãe Yaeko que sempre me apoiaram e me deram forças em todos os momentos. Aos meus irmãos, Jefferson e Jennifer pelo apoio e carinho.

Agradeço em especial a minha orientadora prof^a Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada pela oportunidade, apoio, dedicação, paciência, pelas palavras de incentivo, por todo o ensinamento e confiança a mim depositada.

Ao meu querido Ivan, pelo companheirismo, amor e dedicação.

Aos meus queridos amigos de laboratório Virlene, Jéssica, Larisse, Mariana, Juliana e Antônio que me auxiliaram, ajudaram, contribuíram para a realização deste trabalho, e também pelas horas de descontração.

A prof^a Maria Eugênia da Silva Cruz (*In memoriam*) por ter me acompanhado nos primeiros passos dessa jornada. Ao prof Arney Eduardo do Amaral Ecker pelos conselhos e palavras de incentivo.

A Universidade Estadual de Maringá e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia pela oportunidade concedida. A todos os professores e funcionários.

A Faculdade Ingá pelo espaço cedido para a condução do experimento.

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

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho,

Muito Obrigada!

Extratos vegetais e produtos comerciais no controle de *Diplocarpon rosae* e na indução de resistência em roseiras

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi verificar o potencial de extratos oriundos de plantas medicinais (*Rosmarinus officinalis*, *Equisetum arvense* e *Moringa oleifera*) e produtos comerciais (a base de extratos vegetais, óleos vegetais e fosfito de potássio) no controle *in vitro* e em casa de vegetação de *Diplocarpon rosae* e avaliar a indução de resistência por meio da determinação da atividade específica das enzimas peroxidase, catalase e polifenoloxidase no fitopatógeno e em roseiras. *In vitro* avaliou-se o efeito dos tratamentos sobre o fitopatógeno pelo índice de velocidade de crescimento micelial, inibição do crescimento micelial, inibição da esporulação, índice de esporulação, síntese de proteínas, atividade específica de peroxidase e catalase utilizando extrato bruto aquoso (EBA) de folhas de *R. officinalis* (1%); EBA de caules de *E. arvense* (1%); EBA de sementes de *M. oleifera* (1%); produto comercial a base de extratos vegetais fermentados (0,01%); produto comercial a base de fosfito de potássio (0,01%); produto comercial a base de óleos vegetais (0,01%); Ecolife® (0,01%); fungicida a base de Tiofanato metílico (0,007%); adjuvante (0,0025%) e meio batata dextrose ágar (BDA testemunha) e batata-dextrose (BD testemunha). Em casa de vegetação foram avaliadas incidência e severidade da doença pinta preta, produtividade (número de botões), biometria (comprimento de botões, comprimento e espessura de haste), teor de clorofila e atividade específica de peroxidase, catalase e polifenoloxidase, utilizando os mesmo tratamentos com as doses dez vezes maiores, e a testemunha foi água destilada. O resultado *in vitro* com produto comercial a base de óleos vegetais reduziu 56% o crescimento micelial; EBA de *E. arvense* e produto comercial a base de extratos vegetais fermentados inibiram 81 e 75% a esporulação. Os tratamentos com EBA de *R. officinalis*, EBA de *E. arvense*, EBA de *M. oleifera*, produto comercial a base de óleos vegetais e Ecolife® aumentaram a síntese de proteínas no micélio *D.rosae*. Também no micélio houve aumento da atividade específica das enzimas peroxidase e catalase, no EBA de *R. officinalis* e produto comercial a base de fosfito de potássio, respectivamente. Em casa de vegetação o maior comprimento de haste foi observado no tratamento com produto comercial a base de fosfito de potássio e a maior espessura da haste nos três produtos comerciais. As maiores atividades específicas foram observadas na enzima peroxidase com produto comercial a base de fosfito de potássio na primeira aplicação, catalase, com EBA de *M. oleifera* e fosfito de potássio, na primeira aplicação e polifenoloxidase com EBA de *R. officinalis* e *M. oleifera* na terceira aplicação. Com os

resultados observados, verifica-se que os produtos naturais podem ser utilizados no controle da doença pinta preta e na indução de resistência, apresentando resultados promissores.

Palavras-chave: Controle alternativo, pinta preta, rosas de corte.

Plant extracts and commercial products in control of *Diplocarpon rosae* and resistance induction in roses

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the potential of extracts derived from medicinal plants (*Rosmarinus officinalis*, *Equisetum arvense* and *Moringa oleifera*) and commercial products (based on plant extracts, vegetable oils and potassium phosphite) *in vitro* control and greenhouse of *Diplocarpon rosae* and evaluate through resistance induction of determining the specific activity of oxidative enzymes, catalase and polyphenol in phytopathogen and roses. *In vitro* evaluated the effect of treatments on the pathogen by mycelial growth rate index, inhibition of mycelial growth inhibition of sporulation, sporulation rate, protein synthesis, peroxidase and catalase specific activity using aqueous crude extract (ACE) to *R. officinalis* leaves (1%); ACE *E. arvense* stem (1%); ACE *M. oleifera* seeds (1%); commercial product based on fermented plant extracts (0.01%); commercial product based on potassium phosphite (0.01%); commercial product based on vegetable oils (0.01%); Ecolife® (0.01%); Thiophanate methyl fungicide basis (0.007%); adjuvant (0.0025%) on potato dextrose agar (PDA) and potato dextrose (BD). Under greenhouse conditions were evaluated incidence and severity of disease black spot, productivity (number of buttons), biometrics (length buttons, length and stem thickness), chlorophyll content and peroxidase, catalase and polyphenol oxidase specific activity, using the same treatments with ten times higher doses and the control was distilled water. *In vitro* results with commercial product based on vegetable oils 56% reduced mycelial growth; ACE *E. arvense* and commercial product based on fermented plant extracts inhibited 81 and 75% sporulation. The treatments with ACE *R. officinalis*, *E. arvense*, *M. oleifera*, commercial product based on vegetable oils and Ecolife® increased protein synthesis in *D.rosae* mycelium. Also in the mycelium was increased specific activity of peroxidase and catalase in ACE *R. officinalis* and commercial product based on potassium phosphite, respectively. In a greenhouse the largest stem length was observed in the treatment with the commercial product based on potassium phosphite and the greatest thickness of the stem in the three commercial products. The highest enzyme activities were observed in the peroxidase enzyme with a commercial product based on potassium phosphite in the first application, catalase, ACE *M. oleifera* and potassium phosphite on first application and polyphenol with ACE *R. officinalis* and *M. oleifera* in the third application. Natural products can be used in disease control blight and resistance induction, showing promising results.

Key words: Alternative control, black spot, cut roses.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Médias mensais de precipitação pluvial e temperatura no período de condução do experimento no município de Maringá, PR.....	22
Tabela 2: Classificação do comprimento de botão, comprimento de haste e espessura de haste para rosas de corte	25
Tabela 3: Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), inibição do crescimento micelial (ICM), esporulação e inibição da esporulação do fungo <i>Diplocarpon rosae</i> submetidos aos diferentes tratamentos	29
Tabela 4: Incidência de doença (%) e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em roseiras após a aplicação dos tratamentos	34
Tabela 5: Produtividade (número de botões) e biometria (comprimento de botão, comprimento de haste e espessura da haste) de rosas, na primeira colheita, aos 40 dias após a aplicação dos tratamentos.....	35
Tabela 6: Produtividade (número de botões) e biometria (comprimento de botão, comprimento de haste e espessura da haste), na segunda colheita aos 80 dias após a aplicação dos tratamentos.....	36
Tabela 7: Teores de clorofila a, b e total em roseiras, 25 e 40 dias após a aplicação dos tratamentos. Os valores estão expressos em mg^{-1} tecido fresco.....	37
Tabela 8: Atividade específica da enzima peroxidase ($\text{abs min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína) em folhas de roseiras após aplicação dos tratamentos	38
Tabela 9: Atividade específica da enzima catalase ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína) em folhas de roseiras após aplicação dos tratamentos	40
Tabela 10: Atividade específica da enzima polifenoloxidase ($\text{abs min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína) em folhas de roseiras após aplicação dos tratamentos	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Efeito dos tratamentos sobre a síntese de proteínas no micélio de <i>Diplocarpon rosae</i> cultivado em meio líquido batata-dextrose (BD), após 20 dias.....	31
Figura 2: Atividade específica de peroxidase em micélio de <i>Diplocarpon rosae</i> , cultivado em meio BD contendo diferentes tratamentos, após 20 dias.....	32
Figura 3: Atividade específica de catalase em micélio de <i>Diplocarpon rosae</i> , cultivado em meio BD contendo diferentes tratamentos, após 20 dias.....	33

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2.1 Cultivo de flores e plantas ornamentais.....	3
2.1.1 Cultura da roseira.....	3
2.2 Pinta preta da roseira (<i>Diplocarpon rosae</i>)	5
2.3 Indução de resistência.....	7
2.3.1 Enzimas envolvidas na indução de resistência	8
2.3.2 Peroxidase do guaiacol (EC 1.11.1.7)	9
2.3.3 Catalase (EC 1.11.1.6).....	9
2.3.4 Polifenoloxidase (EC 1.14.18.1)	10
2.4 Uso de produtos naturais no controle de doenças de plantas	11
2.4.1 Plantas medicinais e indução de resistência	11
2.4.2 <i>Rosmarinus officinalis</i>	12
2.4.3 <i>Equisetum arvense</i>	13
2.4.4 <i>Moringa oleifera</i>	14
2.4.5 Produtos comerciais naturais	15
3.1 Ensaio <i>in vitro</i>	17
3.1.1 Material vegetal e obtenção dos extratos brutos aquosos.....	17
3.1.2 Obtenção do isolado	17
3.1.3 Fungitoxicidade <i>in vitro</i>	18
3.2 Síntese de proteínas e indução de respostas de defesa dos extratos brutos aquosos e produtos comerciais à <i>Diplocarpon rosae</i>	19
3.2.1 Síntese de proteínas	20
3.2.2 Obtenção do extrato enzimático	20
3.2.3 Atividade específica de peroxidase do guaiacol.....	20
3.2.4 Atividade específica de catalase	21
3.3 Ensaio em casa de vegetação	21
3.3.1 Obtenção das plantas de roseiras	22
3.3.2 Obtenção dos extratos.....	22
3.3.3 Incidência.....	23
3.3.4. Severidade	23
3.3.5 Produtividade.....	24
3.3.6 Biometria	24

3.3.7 Determinação do teor de clorofila	25
3.4 Análises bioquímicas	25
3.4.1 Coleta das amostras e obtenção do extrato enzimático	25
3.4.2 Determinação de proteína totais	26
3.4.3 Determinação da atividade específica peroxidase do guaiacol	26
3.4.4 Determinação da atividade específica de catalase	26
3.4.5 Determinação da atividade específica de polifenoloxidase	27
3.5 Análise estatística	27
4.1 Fungitoxicidade <i>in vitro</i>	28
4.2 Estudos sobre a síntese de proteínas e indução de respostas de defesa dos extratos brutos aquosos e produtos comerciais à <i>Diplocarpon rosae</i>	30
4.2.1 Síntese de proteína.....	30
4.2.2 Efeito sobre a indução de resposta de defesa	31
4.3 Experimento em casa de vegetação	33
4.3.1 Incidência e severidade.....	33
4.3.2 Produtividade e biometria.....	35
4.3.3 Teor de clorofila	37
4.4 Indução de mecanismos bioquímicos	38
5 CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS	43
APÊNDICE A - Características químicas do solo da área experimental	52
APÊNDICE B – Prancha de fotos	53
ANEXO	54

1 INTRODUÇÃO

A cadeia de flores e plantas ornamentais apresenta constantes crescimentos na produção, exportação e consumo interno. Em nível mundial o mercado de flores e plantas ornamentais engloba a União Européia, Estados Unidos, Japão, Colômbia, Equador, Costa Rica e China. A União Européia representa o principal mercado consumidor mundial de flores, a Holanda destaca-se como o maior exportador e importador de produtos da floricultura (BATALHA e BUAINAIN, 2007).

A floricultura brasileira vem adquirindo notável desenvolvimento, caracterizando-se como um dos mais promissores segmentos do ramo da horticultura intensiva no campo dos agronegócios brasileiros (JUNQUEIRA e PEETZ, 2008).

As estimativas mostram que a cadeia de produção de flores e plantas ornamentais brasileiras corresponde, aproximadamente, a R\$ 4,5 bilhões, ou 0,6% do PIB agrícola do Brasil de R\$ 800 bilhões (CEPEA, 2015). O setor é intensivo em mão de obra, contribuindo para a fixação da população no meio rural, além disso, cerca de 70 a 80% do total de trabalhadores é composto pelo gênero feminino, diferentemente de outras cadeias produtivas do agronegócio nacional (IBRAFLOR, 2015).

A rosa é a principal flor de corte exportada pelo Brasil e também a mais procurada no mercado interno, possui grande diversidade de variedades das mais distintas colorações. Algumas doenças acometem sua produção comprometendo seu desenvolvimento e comercialização. Dentre as doenças fúngicas destaca-se a pinta preta, causada pelo fitopatógeno *Diplocarpon rosae*. Atualmente as medidas de controle estão associadas a somente aplicações com produtos químicos.

Os fungicidas químicos sintéticos apresentam sucesso no controle de várias doenças de plantas, mas seu uso indiscriminado pode levar ao desenvolvimento de resistência aos fungicidas pelos patógenos e causar poluição ambiental, gerando risco à população, aos aplicadores e também aos animais (BIZI, 2011). Algumas alternativas ao uso de químicos na agricultura podem ser utilizadas, como a utilização de extratos de plantas medicinais e também de produtos a base de extratos e óleos de plantas que vem sendo desenvolvidos no controle de determinadas doenças.

Um método de controle muito estudado é a ativação de mecanismos de resistência latentes nas plantas, a indução de resistência. A indução de resistência é caracterizada pela aplicação de um agente indutor que ativa as rotas de sinalização na planta, onde a planta

responde com a produção ou ativação de mecanismos latentes de defesa. Estes mecanismos podem ser tanto estruturais, quanto em forma de respostas bioquímicas, como acúmulo de fitoalexinas e de proteínas relacionadas com a patogênese, como peroxidases, catalases e polifenoloxidasas.

A indução de resistência é um sistema multicomponente, bastante complexo e pode ser ativado por moléculas ou substâncias denominadas elicitores, que podem ter origem abiótica e biótica (PASCHOLATI, 2011). Entre os elicitores estão os extratos de plantas medicinais, que devido a sua riqueza bioquímica, apresentam grandes potenciais para serem empregados na defesa de plantas contra fitopatógenos.

Nesse contexto, pode-se estudar o efeito de extratos oriundos de plantas medicinais, *Rosmarinus officinalis*, *Equisetum arvense* e *Moringa oleifera* como potencial método de controle alternativo, e também alguns produtos comerciais à base de extratos e óleos vegetais. Devido aos poucos trabalhos realizados com produtos alternativos em ornamentais e com alguns resultados promissores de pesquisas que utilizam derivados de plantas, bem como a necessidade de redução do uso de agroquímicos, tais fatores estimularam a realização deste estudo, que visa contribuir com uma agricultura menos agressiva ao meio ambiente.

O objetivo deste trabalho foi verificar o potencial de extratos oriundos de plantas medicinais (*Rosmarinus officinalis*, *Equisetum arvense* e *Moringa oleifera*) e de produtos comerciais (à base de extratos vegetais, óleos vegetais e fosfito de potássio) (no controle *in vitro* e em casa de vegetação de *Diplocarpon rosae* e avaliar a indução de resistência por meio da determinação da atividade específica das enzimas peroxidases, catalases e polifenoloxidasas) no fitopatógeno e em roseiras.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cultivo de flores e plantas ornamentais

No Brasil a área cultivada de flores é de cerca de 15.000 hectares, resultado do aumento da área destinada a essa atividade no país. O tamanho médio de propriedades é de 1,8 hectares, com mais de 350 espécies produzidas e cerca de 3000 variedades. Desse total nacional, o estado de São Paulo produz 46%, com 7.000 hectares, seguido pelo Rio Grande do Sul e Santa Catarina que produzem 9% e 7%, com 1.360 e 998 hectares, respectivamente. O estado do Paraná contribui com cerca de 2% da área nacional destinada ao cultivo de flores. A região Sudeste concentra cerca de 4.000 produtores, seguida pela região Sul com cerca de 2.200 (IBRAFLOR, 2015).

O cultivo divide-se em plantio em estufas, sombrite e a campo. O cultivo ainda se divide em flores de corte, plantas em vaso, mudas e plantas para jardins. As plantas são divididas herbáceas, palmeiras, arbóreas, arbustos, gramas, e podem ser aquáticas, trepadeiras e suculentas.

O setor da floricultura, segundo IBRAFLOR (2014) obteve faturamento de mais de R\$ 5,4 bilhões e estima-se um crescimento de 8% em 2015. O Estado de São Paulo destaca-se com 37% ou R\$ 1,98 bilhão, seguido pelos Estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais com R\$ 622 milhões e R\$ 554 milhões respectivamente, ou 11% e 10%. O Estado do Paraná contribuiu com 6% do faturamento brasileiro de flores e plantas ornamentais, R\$ 324 milhões.

No Estado do Paraná estima-se que atualmente haja cerca de 160 produtores de flores e plantas ornamentais. Este conjunto de produtores cultiva uma área de 420 hectares, gerando um valor bruto da produção que atingiu em 2013, segundo levantamentos do Departamento de Economia Rural (DERAL) da Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento do Paraná (SEAB, 2014), R\$ 34.689.000,00, sem considerar o setor de gramas. No Paraná há cinco núcleos regionais de importância econômica para o segmento de flores e plantas ornamentais: Maringá, Curitiba, Cascavel, Londrina e Apucarana (SEBRAE,2015).

2.1.1 Cultura da roseira

No Brasil, segundo a IBRAFLOR (2014) as principais espécies e grupos de plantas ornamentais são divididos em três categorias: flores e plantas de vasos (antúrio, begônia,

kalanchoe); plantas ornamentais e para paisagismos (forrações, cactos, suculentas) e flores e folhagem de corte (rosa, lírio, orquídeas)

As rosas pertencem à Classe das Angiospermas, Subclasse Dicotiledônea, Ordem Rosales e Família Rosaceae, gênero *Rosa* sp. possuindo grande número de espécies e variedades que distinguem-se pela coloração das pétalas, forma do botão e comprimento das hastes. A roseira é uma planta arbustiva, perene, com hábito de crescimento ereto, caule lenhoso e com ou sem espinhos. As flores se desenvolvem no ápice das hastes, contendo, normalmente, cinco sépalas e cinco pétalas (JOLY, 2002).

A família Rosaceae agrupa 95 gêneros e tem sido descrita como de difícil definição, graças à grande diversidade morfológica que exhibe (DICKINSON et al., 2002).

Para o crescimento e desenvolvimento da cultura, as temperaturas ótimas são de 17°C a 25°C, com temperatura mínima de 15°C durante a noite e máxima de 28°C durante o dia aceitando valores ligeiramente inferiores ou superiores sem que ocorram danos a cultura (INFOAGRO, 2003). Segundo Barbosa (2003) as roseiras são exigentes quanto a insolação, necessitando de grande exposição ao sol, em dias longos o crescimento é maior que em dias curtos, embora não seja influenciada por fotoperíodo. A luminosidade em ambiente protegido é um fator limitante para a produção de rosas, pois quanto maior a disponibilidade de luz, maior a fotossíntese. Apesar disso, quando as folhas atingem o máximo de absorção de luz não há mais incremento na fotossíntese, permanecendo seu nível estável (CASARINI, 2004).

As roseiras dependem da intensidade e frequência das irrigações, o estresse de água durante um longo período pode conduzir ao encurvamento, a senescência precoce das folhas, provocando nas plantas lignificação dos tecidos, folhas menores, mais claras, e uma desproporção entre o botão floral e o tamanho das hastes (White & Holcomb, 1987 citado por Casarine 2000).

As roseiras encontram-se entre as espécies ornamentais mais conhecidas em todo o mundo. Sua haste floral está entre as flores mais admiradas, pela sua beleza e simbologia. A rosa é a principal flor de corte exportada pelo Brasil e também a mais procurada no mercado interno. De acordo com Reich e Carvalho (2004), a coloração do botão floral com maior demanda de mercado é a vermelha, procurada por 29% dos consumidores.

Dentre a grande diversidade de variedades de rosas vermelhas, encontra-se a Grand Gala, caracterizada pela coloração vermelho escura de suas pétalas e caule com poucos espinhos. É comumente utilizada para realização de arranjos florais, devido a facilidade no manuseio. É uma rosa de grande aceitação e tende a se expandir no mercado.

A produção de rosas pode ser conduzida tanto em ambiente aberto, quanto em ambientes fechados. No Brasil, estima-se que a área ocupada pelo cultivo de flores e plantas ornamentais a céu aberto está entre 67% e 70%, em estufas de 28% e 30% e apenas entre 3% e 5% sob a proteção de telados (SEBRAE, 2015). Considerando as vantagens entre os três sistemas de cultivo a produção em casa de vegetação (estufa) possibilita maior rendimento por área, melhor qualidade do produto, melhora na execução de tratamentos culturais (SEBRAE, 1999), além da proteção oferecida quanto aos fenômenos climáticos como geadas, excesso de chuvas, sol forte durante o dia e queda da temperatura à noite.

Para a aceitação do produto final da cultura no mercado, são observadas algumas características importantes na etapa de classificação, como o comprimento da haste e do botão floral, a espessura da haste e o ponto de abertura do botão. A ausência de defeitos graves, como danos causados por doenças, pragas e mecânicos nas folhas e na flor, é recomendada para uma haste de qualidade, pois esses defeitos podem evoluir durante o processo de comercialização (IBRAFLOR, 2015).

Devido aos danos observados nas hastes florais um dos desafios dos produtores de flores está o controle de doenças e pragas, que ocorrem em grande número e podem causar danos que depreciam as flores. As doenças em roseiras podem ser causadas por fungos, bactérias, vírus e nematoides (REIS et al., 2009). O manejo inadequado da cultura contribui para o aumento da incidência e da severidade dos problemas fitossanitários, ocasionando perdas na produtividade e desvalorizando as flores para a comercialização.

A ocorrência de doenças fúngicas que acometem as roseiras como oídio (*Sphaerotheca pannosa*) e pinta preta (*Diplocarpon rosae*) que atacam a parte aérea e o mofo cinzento (*Botrytis cinerea*), os botões florais em formação, diminuem a qualidade e quantidade das flores produzidas, bem como o aumento nos custos de produção dos produtores para realizarem o controle. Dentre estas doenças destaca-se a pinta preta (ALMEIDA et al., 2012)

2.2 Pinta preta da roseira (*Diplocarpon rosae*)

A pinta preta da roseira está amplamente distribuída em todas as regiões produtoras de rosas do mundo, Europa, Estados Unidos, Canadá, China, Japão, África do Sul, Índia, Turquia, Filipinas, Hawaii, Nova Zelândia e América do Sul (AGROFIT, 2015). No Brasil

está distribuída nos diferentes estados produtores de rosa como, Pernambuco, Rio Grande do Sul, Minas Gerais, São Paulo e Paraná.

A doença manifesta-se inicialmente na forma de manchas descoloridas na parte adaxial das folhas. Com o tempo as manchas vão escurecendo e seu tamanho vai aumentando até cerca de 10 mm de diâmetro, podendo notar a presença de bordos franjados ao seu redor. As manchas se coalescem tornando-se amarelas e causando desfolha na planta. As pétalas podem apresentar sardas vermelhas, acompanhadas de distorções moderadas. Os sintomas também podem ser observados nas hastes, porém em menor intensidade. As hastes novas podem desenvolver pústulas elevadas, irregulares, púrpuras a vermelhas, tornando-se negras, mas não provocam a morte das plantas, porém possibilita a sobrevivência do patógeno (KIMATI, 2005).

A doença é causada pelo patógeno na sua fase teleomórfica *Diplocarpon rosae* Wolf (Wolf 1912) e anamórfica *Marssonina rosae* (Lib.) Lind (Baker 1948). Pertencem ao filo Ascomycota, Classe Leotiomycetes, Subclasse Leotiomycetidae, Ordem Helotiales e Família Dermateaceae. Sua fase anamórfica produz acérvulos de 50 a 400 µm e esporos binucleares, com uma célula afilada e a outra rombuda. Os conídios medem 15-25 x 5-7 µm e aparecem na superfície sobre uma massa esbranquiçada. Quando nova, suas hifas são hialinas, mas escurecem com o tempo. Raramente a forma perfeita é formada, ocorrendo em países de clima frio (KIMATI et al., 2005).

O fungo necessita de condições ambientais favoráveis como elevadas umidades e altas temperaturas para desenvolver-se. Para a germinação dos conídios e infecção, precisam de molhamento foliar, com água livre no tecido por mais de sete horas (KIMATI et al., 2005).

Sua disseminação se dá principalmente por conídios que são dispersos por respingos de água da chuva ou irrigação de aspersão, pelo vento ou por insetos. Pode ser disseminado à longa distância através de mudas infectadas ou em folhas infectadas que acompanham as flores na comercialização. Sobrevive na forma de micélio, acérvulos, apotécios ou conídios nas hastes infectadas da planta e também saprofiticamente em folhas caídas e em hastes infectadas cortadas e deixadas no solo (KIMATI et al., 2005).

Para o controle pode ser realizado o manejo cultural, o uso de cultivares resistentes e aplicação de fungicidas. Para o controle preventivo, deve-se evitar a permanência de lâmina de água sobre as folhas, principalmente durante a noite; retirar as folhas e hastes com sintomas, caídas no chão e evitar plantações muito adensadas, facilitando a circulação de ar (ALMEIDA et al., 2012).

Dentre as variedades resistentes à pinta preta podemos citar a David Thompsom, Bebe Lune, Coronado, Erbest H. Morse, Fortyniner, Grand Opera, Lucy Cromphorn, Sphinx, Tiara, Carefree, Beauty e Simplicity (AGROFIT, 2015).

O controle químico da doença é realizado preventivamente por meio de pulverizações regulares com produtos químicos a base de Tiofanato metílico, clorotalonil, captan, metconazol, entre outros (AGROFIT, 2015). Porém, a grande quantidade de defensivos químicos no cultivo de rosas, pode trazer consequências para os trabalhadores, para os consumidores e para o meio ambiente.

Devido ao uso indiscriminado de produtos químicos e seus efeitos residuais, a busca por alternativas aos controles convencionais vem sendo amplamente estudada. Métodos alternativos de origem natural, como extratos botânicos podem ser menos tóxicos ao homem e ao meio ambiente (STANGARLIN et al., 1999) e podem ativar os mecanismos de defesa das plantas contra os fitopatógenos (indução de resistência a planta sobre fitopatógenos).

2.3 Indução de resistência

A indução de resistência pode ser definida como a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e/ou subsequente atividade do patógeno em seus tecidos (PASCHOLATI e LEITE, 1995).

Para o patógeno infectar uma planta, ele precisa penetrar e colonizar os tecidos do hospedeiro, retirando os nutrientes necessários para sua sobrevivência, e também neutralizar as reações de defesa da planta. O patógeno necessita, para isso, utilizar enzimas, toxinas, hormônios, dependendo da interação patógeno-hospedeiro. Em contra partida, a planta para se defender desse ataque, utiliza mecanismos, que podem ser pré (estruturais) ou pós-formados (bioquímicos), existentes antes da chegada do patógeno, ou ativados após a chegada do patógeno (AMORIM et. al, 2011).

Os mecanismos estruturais constituem-se em barreiras físicas à penetração e/ou colonização do patógeno, e os mecanismos bioquímicos englobam substâncias capazes de inibir o desenvolvimento do patógeno ou gerar condições adversas para a sobrevivência nos tecidos do hospedeiro (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008).

Segundo Pascholati (2011) os mecanismos pós-formados (ativos ou induzíveis) podem ser estruturais: papilas, halos, lignificação, glicoproteínas ricas nos aminoácidos hidroxiprolina e glicina, camadas de cortiça, camadas de abscisão, tiloses e bioquímicos

como: fitoalexinas, proteínas relacionadas à patogênese (ex: peroxidase, catalase e polifenoxidase) e espécies ativas de oxigênio (EAOs).

2.3.1 Enzimas envolvidas na indução de resistência

As defesas das plantas podem ser ativadas por meio de agentes bióticos (tentativa de infecção por fitopatógenos) ou abióticos (compostos químicos), de natureza inorgânica, orgânica ou sintética.

As plantas respondem ao ataque de fitopatógenos através de uma “explosão oxidativa”, ativando a produção de espécies ativas de oxigênio, principalmente ânion superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (HU et al., 2009). O acúmulo destas substâncias nas células vegetais pode ser tóxico tanto para a planta quanto aos agentes estressores. O H_2O_2 é a principal espécie ativa de oxigênio que pode funcionar diretamente como moléculas na indução de genes de defesa ou funcional na cascata de sinalização que culminará na ativação destes por meio de outras moléculas. O H_2O_2 também faz parte da polimerização de proteínas que compõe a parede celular, além de estimular a produção de enzimas antioxidativas ou de limpeza (ŁUKASIK et al., 2012).

As moléculas capazes de ativar respostas de defesas nas plantas são chamadas de elicitores, atuando como indutores de resistência (STICHER et al., 1997). Os elicitores podem induzir a resistência sistêmica induzida (SIR) ou a resistência sistêmica adquirida (SAR) (TERRY e JOYCE, 2004).

A resistência sistêmica adquirida é ativada por fungos, bactérias e vírus, para que ela ocorra, a infecção inicial precisa resultar na formação de lesões necróticas, decorrentes da reação de hipersensibilidade (acúmulo de peróxido de hidrogênio) ou como sintoma da doença (HAMMOND-KOSACK e JONES, 2000). A participação de compostos, como o óxido nítrico, etileno, ácido jasmônico (JA) e ácido salicílico (SA), tem sido sugerida como sinalizadores da SAR. A participação do SA na SAR deve-se à sua presença, em altos níveis, em plantas que apresentam esta resposta (DOREY et al., 1997; DURNER et al., 1997).

O mecanismo da SIR deve envolver uma cascata de eventos e sinais, os quais iniciam-se no momento da interação planta/patógeno ou do tratamento com fatores abióticos, levando a alterações no seu metabolismo celular, culminando com a emissão de sinais moleculares dirigidos para outras partes da planta, atuando de forma inespecífica, promovendo a redução da severidade da doença. Em resposta à distribuição dos sinais dentro da planta, esta seria

induzida a sintetizar agentes de defesa, incluindo as PR-Proteínas, além da formação de barreiras estruturais, como a lignina (FERNANDES, 2009).

2.3.2 Peroxidase do guaiacol (EC 1.11.1.7)

A peroxidase é uma enzima que catalisa a oxirredução entre H_2O_2 e vários redutores, está presente em tecidos de animais, plantas e microrganismos. Esta enzima também participa de uma ampla variedade de processos fisiológicos nas plantas, como lignificação, suberização, formação e reticulação de componentes da parede celular, catabolismo de auxinas, senescência e na proteção contra ataques de patógenos, insetos e estressores abióticos. Pode ser dividida em três superfamílias, baseada na sua estrutura e propriedades catalíticas. É uma enzima relativamente estável em alta temperatura e atualmente vem sendo usada como um modelo em estudos de estrutura proteica, reações e funções enzimáticas e tem sido relacionada a processos de desenvolvimento de defesa da planta em respostas a estresses bióticos e abióticos (HIRAGA et al., 2001; ALMAGRO et al., 2009; GULSEN et al., 2010; WAR et al., 2012). As peroxidases, bem como outras enzimas como a superóxido dismutase e a catalase, atuam sobre as EROs de modo a livrar a célula de seu efeito deletério.

Geerdink (2012) testando diferentes aplicações (0, 200, 400 e 800 mg L⁻¹) de silício em pré colheita de rosas ‘Vega’, observou que na dose de 400 mg L⁻¹ houve uma menor atividade de peroxidase. Em tratamento pós-colheita com 0,1 mM de salicilato de metila, 1 uL L⁻¹ de 1-metilciclopropeno (1-MCP) e 1 mM de ácido salicílico (AS), observou maior atividade de peroxidase com os tratamentos AS e 1-MCP. A autora verificou que a menor atividade inicial apresentada pelas hastes tratadas com silício pode ter sido devido a maior resistência á estresse relacionado à colheita, perda do balanço hídrico e senescência. Já a sua maior atividade, pode ser explicada por tratar-se de uma enzima de combate a radicais livres, permitindo melhor manutenção das membranas e do metabolismo celular, beneficiando a qualidade das flores.

2.3.3 Catalase (EC 1.11.1.6)

As catalases são indispensáveis para desintoxicação das células das plantas em condições de estresse. A enzima é responsável pela dismutação direta de H_2O_2 em H_2O e O_2 , removendo o peróxido gerado nos peroxissomos por oxidases envolvidas na oxidação de

ácidos graxos, fotorrespiração e catabolismos de purinas (GILL e TUTEJA, 2010). Níveis elevados de H_2O_2 são tóxicos para a planta, porém em baixas concentrações desempenha um papel muito importante na transdução de sinal nas plantas atacadas e nos seus estressores bióticos, como fungos e insetos (PRASAD et al, 1994). A catalase é a principal via de degradação H_2O_2 , portanto a inibição da atividade dessa enzima resulta na ativação da resistência sistêmica adquirida. Este sistema é ativado quando as plantas são atacadas, principalmente, por fungos fitopatogênicos no qual o seu crescimento é inibido na área infectada (GAYATRIDEVI et al., 2012).

Maia et. al (2014) estudaram as características do óleo essencial de alecrim, seu efeito na produtividade, no controle da mancha da folha e do míldio e na indução de resistência em videira 'Isabel' com os tratamentos das doses do óleo essencial: 0, 500, 1.000, 2.000 e 4.000 $\mu L L^{-1}$, além dos tratamentos Tween 80%, calda bordalesa, acibenzolar-S-metil e mancozebe. Observaram redução na atividade da catalase nas folhas e que as doses de 1.000 e 2.000 $\mu L L^{-1}$ do óleo essencial de alecrim induzem resistência em videira, pelo aumento na atividade das quitinases e pela redução na atividade das catalases.

2.3.4 Polifenoloxidase (EC 1.14.18.1)

A polifenoloxidase agrupa um conjunto de enzimas que são responsáveis pela catálise da reação de oxidação de polifenóis, transformando-os em quinonas, constituindo uma atividade de difenolase. Também são conhecidas como tirosinases, cresolases, catecolases, difenolases e fenolases (OKO-KOTBER et al., 2002). São enzimas intracelulares que podem ocorrer em animais, plantas, e em várias espécies de bactérias e fungos (FLURKEY, 1989; WHITAKER, 1994).

De maneira geral estão distribuídas em todas as estruturas das plantas, podendo alguns órgãos ou tecidos conter maiores concentrações. O nível pode variar em função da espécie, cultivar ou do ambiente, podendo sua expressão ser induzida por ferimentos (CONSTABEL et al., 1995). Conforme ocorre a ruptura da célula ocasionada por ferimentos de ação de insetos ou patógenos, ou ainda, senescência, as polifenoloxidases são liberadas e iniciam o processo de oxidação dos compostos fenólicos (MOHAMMAD e KAZEMI, 2002; THIPYAPONG et al., 2004).

Cavasini (2013) estudando a durabilidade pós-colheita de hastes de lisianthus (*Eustoma grandiflorum*), planta ornamental, submetidas ao tratamento com inibidores de

etileno (1-metilciclopropeno 1-MCP e ácido salicílico AS) e diferentes temperaturas de armazenamento, observou que a atividade enzimática aumentou com a senescência do material, tendo relação direta com a concentração de fenóis que se acumulam nos tecidos lesionados. A autora atribuiu a atividade das enzimas peroxidase e polifenoloxidase como marcadores bioquímicos para a qualidade visual do produto.

2.4 Uso de produtos naturais no controle de doenças de plantas

Os métodos alternativos para o controle de doenças de plantas têm por finalidade oferecer alternativas para diminuir o uso de defensivos agrícolas, o que contribui para uma agricultura mais adequada a qualidade ambiental e da sociedade moderna (BETTIOL, 2009). Com a busca pela diminuição do uso de químicos na agricultura, tem se abordado cada vez mais a utilização de métodos de controle como extratos vegetais oriundos de plantas medicinais.

As plantas medicinais são capazes de produzir substâncias biologicamente ativas, que influenciam de alguma maneira na alteração metabólica de um determinado organismo. Pesquisas desenvolvidas com extrato bruto ou óleo essencial, obtidos de plantas medicinais, têm indicado o potencial das mesmas no controle de fitopatógenos, tanto por sua ação fungitóxica direta quanto por alterações fisiológicas na planta, como indução de enzimas relacionadas à patogênese e fitoalexinas, lignificação da folha, entre outras (SCHWAN-ESTRADA e STANGARLIN, 2005).

O uso de vegetais em proteção de plantas quando comparado aos produtos sintéticos tem uma vantagem, o fato de gerar novos compostos os quais os patógenos não se tornaram capazes de inativar, além de serem menos tóxicos, serem degradados rapidamente pelo ambiente, possuírem um amplo modo de ação e de serem derivados de recursos renováveis (FERRAZ, 2008).

2.4.1 Plantas medicinais e indução de resistência

As plantas medicinais, devido à grande riqueza química tornam-se fontes potenciais de moléculas que podem ser empregadas na defesa de plantas contra fitopatógenos (RODRIGUES et al., 2006, SCWAN-ESTRADA et al., 2008).

Algumas plantas apresentam propriedades antifúngicas em seus extratos vegetais e óleos essenciais, o que depende de uma série de fatores, como as partes das plantas utilizadas, a idade e o estágio vegetativo. A eficiência dos seus subprodutos também depende da espécie envolvida, do tipo de doença a ser controlada e dos processos tecnológicos utilizados na obtenção e manipulação do extrato (SILVA et al., 2005).

Os óleos vegetais, dentre eles os essenciais desenvolvem funções relacionadas com sua volatilidade e atuam na atração de polinizadores, na proteção contra patógenos, perda de água e aumento de temperatura e também desempenhando funções ecológicas, especialmente como inibidoras de germinação. Essas características tornam as plantas que os produzem poderosas fontes de agentes biocidas (KNAAK e FIUZA, 2010).

Algumas plantas medicinais tem se destacado por suas propriedades antimicrobianas como *Rosmarinus officinalis*, *Equisetum arvense* e *Moringa oleifera*.

2.4.2 *Rosmarinus officinalis*

Rosmarinus officinalis L., é conhecido popularmente como alecrim, rosmarinho, erva coada, flor do olimpo (LORENZI e MATOS, 2006). Pertence a Classe Magnoliopsida, Família Lamiaceae (WANG et al., 2008) sendo originário da Região Mediterrânea é um arbusto perene, podendo atingir até 2 m de altura. Possui o caule lenhoso e muito ramificado. Quanto a sua composição química, é constituído por óleo essencial com pineno, canfeno, borneol, cineol, taninos, alcalóides, saponinas, flavonóides e ácido rosmarínico (VAZ e JORGE, 2006). Apresenta princípios ativos como: 1,8 cineol, α -pineno, borneol, cânfora, acetato de isobomila, valerianato de isonila, ácido cítrico, glicólico, glicínico, rosmarímico, nicotianamida, colina, pectina e rosmaricina. Destes, o 1,8 cineol, α -pineno, borneol e cânfora têm atividade antimicrobiana conhecida (GACHKAR et al., 2007).

Soylu et al. (2006) avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *R. officinalis* no desenvolvimento *in vitro* de *Phytophthora infestans* através da inibição total do patógeno, tanto por contato direto quanto pela ação de compostos voláteis na redução da formação de esporângios e pelas alterações na morfologia das hifas e dos vacúolos do fungo. Díaz Dellavalle et al. (2011), obtiveram resultados semelhantes ao utilizar diferentes extratos (ácidos, aquoso e tampão de solução salina) de dez plantas entre elas o *R. officinalis* sobre o crescimento de *Alternaria* spp. e observaram que os extratos ácidos eram mais eficazes e que apesar da baixa concentração ($1,25 \mu\text{g mL}^{-1}$) exibiu os mesmo efeitos que o fungicida.

Itako et al. (2008) testaram, *in vitro*, a fungitoxidade de extrato bruto aquoso (EBAs) de *Achillea millefolium*, *Artemisia camphorata*, *Cymbopogon citratus* e *R. officinalis* contra *Alternaria solani* e puderam verificar que os EBAs não inibiram o crescimento micelial, porém tiveram efeitos significativos na redução da esporulação e da germinação de conídios, principalmente os EBAs de *A. camphorata*, *C. citratus* e *R. officinalis*, a partir da concentração de 20%.

2.4.3 *Equisetum arvense*

Equisetum arvense L., conhecida como cavalinha, rabo-de-cavalo, erva-canudo, lixa-vegetal, entre outros, pertence à família das Equisetaceae, nativa do Continente Americano e distribuída por todo território brasileiro principalmente na região sul (SANTOS, BRUSCATTO e HECK, 2009). A planta pode atingir 1,30 m de altura (LORENZI, 2000), é uma planta perene, possui caules férteis e estéreis, finos, ocos e articulados, constituída de ácido silícico, flavonóides, triglicerídeos, alcalóides, ácidos orgânicos, saponinas, taninos, resinas, vitamina C, lignanos e sais minerais diversos (potássio, cálcio, fósforo, ácido silícico e compostos hidrossolúveis, derivados do silício) (VAZ e JORGE, 2006).

O extrato de espécies de *Equisetum* proporciona maior rigidez estrutural aos tecidos vegetais, dificultando a penetração de hifas de fungos e aumentando a resistência alguns insetos fitófagos, além de influenciar o acúmulo de compostos fenólicos. Por possuir um alto teor de silício confere a planta uma ação fitoprotetora. O chá de cavalinha quando aplicado sobre as plantas pode agir durante todo o período produtivo até na pós-colheita, sendo eficaz no controle de desenvolvimento de fungos evitando sua proliferação em substratos de mudas para horticultura (BERTALOT et al., 2010).

Bertalot et al. (2009), utilizaram extratos de cavalinha no controle alternativo de doenças do morangueiro da var. Caminho real utilizando decocção de *Equisetum giganteum* (10g L⁻¹) e observaram que o extrato atuou no controle de manchas foliares (micosferela) causada pelo fungo *Mycosphaerella fragariae*.

Camatti-Sartori et al. (2011), verificando a atividade de extratos vegetais de alecrim (*R. officinalis*), cavalinha (*E. arvense*), camomila (*Matricaria chamomilla*), louro (*Laurus nobilis*), manjeriço (*Ocimum basilicum*), menta (*Mentha piperita*), eucalipto (*Eucaliptus citriodora*), alho (*Allium sativum*) e gengibre (*Zingiber officinale*) sobre *Fusarium* sp. e *Botrytis* sp., isolados de *Gerbera* sp. e *Rosa* sp., observou que extratos acéticos a 25 e 50% e

etanólicos a 50% de *E. arvense* inibiram o desenvolvimento micelial de *Botrytis* sp. em mais de 50%.

2.4.4 *Moringa oleifera*

Moringa oleifera L., originária da Índia, popularmente conhecida como moringa, lírio branco e quiabo de quina pertence a Classe Magnoliopsida, Família Moringaceae, composta de apenas um gênero (*Moringa*) e quatorze espécies. O seu fruto é uma espécie de vagem com três faces e grande número de sementes (BEZERRA et al., 2004). A planta é arbórea de rápido crescimento, atingindo até 12 m de altura (RANGEL, 1999).

De acordo com Ferreira et al., (2008) todas as partes da moringa são fontes de compostos fenólicos, β -caroteno, vitamina C e proteínas totais, inclusive os aminoácidos essenciais sulfurados metionina e cisteína. Os conteúdos de proteínas e óleo nas sementes são mais elevados que aqueles encontrados em legumes e em algumas variedades de soja, respectivamente. Os ácidos graxos insaturados, principalmente o ácido oléico, carboidratos e minerais estão presentes nas sementes em quantidades razoáveis. No geral, a planta possui baixas concentrações de fatores antinutricionais, embora as sementes possuam glucosinolatos ($65,5 \mu\text{mol. g}^{-1}$), fitatos (41g kg^{-1}) e atividade hemaglutinante, enquanto as folhas possuem consideráveis quantidades de saponinas (80g kg^{-1}), além de fitatos (21g kg^{-1}) e taninos (12g kg^{-1}).

Em estudo realizado por Gomes (2002) pode-se verificar que sementes de moringa são ricas em proteínas ligantes à quitina, que é um constituinte de insetos, fungos e nematoides, portanto é provável que essa resistência esteja de alguma forma relacionada a componentes protéicos dessa natureza. Gifoni et al. (2012) purificaram e caracterizaram uma glicoproteína ligante à quitina, termoestável, com potente atividade contra fungos fitopatogênicos, a partir de sementes de moringa.

O extrato metanólico de moringa foi testado nas doses de 2, 4 e 6 mg L⁻¹ no crescimento micelial dos fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Cladosporium sphaerospermum* e *Colletotrichum lindemuthianum*. A dose de 6 mg L⁻¹ inibiu o crescimento dos fungos em 55,9; 42,0 e 47,4% respectivamente (SILVA et al., 2009).

Cruz et al. (2013), estudando o extrato aquoso e o óleo de *M. oleifera* na conservação de banana em pós-colheita, verificaram que os extratos de folhas de moringa (3% v/v) proporcionaram menores reduções de comprimento e de diâmetro dos frutos. Já o óleo de

moringa (3% v/v) proporcionou menor severidade da doença antracnose (*Colletotrichum musae*).

Rodrigues et al., (2013) avaliaram *in vitro* a fungitoxicidade dos extratos das folhas (50%), das sementes (1,5%) e do óleo de *M. oleifera* (0,5%) contra *Corynespora casicola*, causador da mancha-alvo do tomateiro. Os autores verificaram que todos os tratamentos apresentaram menores valores do progresso da doença em relação a testemunha, com destaque para o extrato da folha de *M. oleifera* obtido por infusão.

2.4.5 Produtos comerciais naturais

Algumas empresas vêm desenvolvendo produtos naturais, a base de extratos vegetais fermentados, fosfito de potássio e óleos vegetais para o controle de doenças de plantas. Os compostos secundários que são produzidos por algumas plantas podem ser utilizados para o desenvolvimento de novos defensivos naturais, bem como no desenvolvimento de novos produtos. Os produtos comerciais, em sua maioria, são líquidos compostos por diferentes complexos enzimáticos e buscam melhorar a capacidade nutricional da planta e ativar seus mecanismos de defesa (ARVENSIS, 2015). Os produtos naturais obtidos de matéria-prima vegetal oferecem larga variedade de moléculas com grande diversidade nas suas estruturas e na atividade biológica (REIGOSA e PEDROL, 2002).

Os fosfitos apesar de serem considerados adubos devido a sua incompleta oxidação, apresentam maior solubilidade e absorção, além de provocarem efeitos únicos sobre o metabolismo das plantas. Alguns trabalhos demonstram que os fosfitos atuam diretamente sobre o fungo, enquanto outros afirmam que ocorre a ativação dos mecanismos de defesa das plantas (LOVATT e MIKKELSEN, 2006). O fosfito de potássio é um sal de ácido fosforoso ligado ao potássio que apresenta a capacidade de estimular a planta para que esta forme substâncias de autodefesa, protegendo-a do ataque de fungos (SONEGO et al., 2005).

O Ecolife® é um fertilizante orgânico que auxilia na melhor utilização de nutrientes pelas plantas que contém bioflavonóides e fitoalexinas cítricas, ácidos ascórbico, cítrico e láctico. Os tecidos das plantas são induzidos a sintetizar suas próprias fitoalexinas, que reduzem os danos causados por fungos. Os ácidos orgânicos e os bioflavonoides conferem ao Ecolife® ação antioxidantes. O produto além de melhorar a resistência das plantas a "stress", tem sido muito utilizado como ativador de resistência a doenças causadas por bactérias e fungos. Esse produto tem ação sinérgica entre seus componentes. O Ecolife® regula o vigor

vegetativo, proporcionando um melhor direcionamento energético para necessidades reprodutivas das plantas (CAVALCANTI et al. 2006; SILVA, 2007).

Gurgel et al. (2014) estudaram diferentes indutores (Bion®, Jasmonato , Agro-mos®, Crop-Set®, Ecolife®) no manejo da antracnose pós-colheita em *Heliconia rostrata*. As helicônias responderam à aplicação dos indutores com menores níveis de severidade, em todos os tratamentos, com exceção do Bion®, em relação à testemunha. Segundo o autor os indutores Ecolife® e jasmonato proporcionaram menor severidade, quando utilizados na menor (100mL 100L⁻¹) e maior (30 mg L⁻¹) dose, respectivamente.

O fungicida do grupo químico Benzimidazol, a base de Tiofanato metílico é utilizado para o controle de doenças fúngicas, como a pinta preta, via aplicação foliar em algumas ornamentais, dentre elas a rosa.

O LI700® é um adjuvante composto por uma mistura de Lecitina e Ácido Propiônico, sua utilização visa melhorar a distribuição e aderência dos produtos na superfície da planta, promovendo uma cobertura mais uniforme e um contato mais direto do produto e a planta, auxiliando a penetração e a eficácia de aplicação dos produtos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os ensaios experimentais foram realizados *in vitro* para o controle do crescimento micelial de *Diplocarpon rosae* e em casa de vegetação no controle da pinta preta da roseira, utilizando extratos vegetais aquosos e produtos comerciais naturais na indução de resistência.

3.1 Ensaios *in vitro*

Os ensaios experimentais *in vitro* foram conduzidos no Laboratório de Controle Alternativo e Indução de Resistência, Bloco T33, junto ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, no período de Maio a Outubro de 2015.

3.1.1 Material vegetal e obtenção dos extratos brutos aquosos

O material vegetal utilizado no experimento *in vitro* foram folhas de *Rosmarinus officinalis* L., caules de *Equisetum arvense* L. e sementes de *Moringa oleifera* L., colhidas no terço superior das plantas, no Outono no período da manhã e em área experimental localizada no Município de Maringá-PR.

Para a obtenção dos extratos brutos aquosos (EBA) foram utilizadas 10g de folhas de *Rosmarinus officinalis* L., trituradas em 100 mL de água destilada por 2 min, em liquidificador e em seguida filtrada em gaze. O mesmo procedimento foi feito para a obtenção do EBA com caules de *Equisetum arvense* L. e com sementes retiradas das cápsulas secas de *Moringa oleifera* L.

3.1.2 Obtenção do isolado

O fitopatógeno *Diplocarpon rosae* foi obtido a partir de folhas de roseiras com sintomas típicos da doença pinta preta. As folhas foram coletadas da área experimental da Faculdade Ingá. Os fragmentos foram retirados do tecido doente da folha e posteriormente submetidos à desinfecção prévia em solução de hipoclorito de sódio, álcool 70% e água destilada. Em seguida, foi feita a transferência dos fragmentos para placas de Petri contendo meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar). As placas foram mantidas a 25°C em estufa incubadora tipo B.O.D. durante 10 dias, no escuro e fotoperíodo de 12 horas. Após este

período, discos de micélio do isolado foram transferidos para placas de Petri contendo meio BDA foram mantidas sob as mesmas condições até o momento de utilização nos respectivos ensaios.

3.1.3 Fungitoxicidade *in vitro*

Para o ensaio *in vitro* foram utilizados os seguintes tratamentos: EBA de folhas de *R. officinalis* (1%); EBA de caules de *E. arvense* (1%); EBA de sementes de *M. oleifera* (1%); produto comercial a base de extratos vegetais fermentados (0,01%); produto comercial a base de fosfito de potássio (0,01%); produto comercial a base de óleos vegetais (0,01%); Ecolife® (0,01%); fungicida a base de Tiofanato metílico (0,007%); adjuvante (0,0025%) e somente meio BDA (controle). Nos tratamentos com produtos comerciais foram adicionados 0,0025% de adjuvante.

Os tratamentos foram incorporados em meio BDA fundente e vertidos 20 mL em placas de Petri e após a solidificação, discos de micélio (7mm de diâmetro) do isolado fúngico foram depositados no centro das placas, posteriormente mantidas em câmara de crescimento a 25°C e fotoperíodo de 12h. Placas contendo apenas o meio BDA foram utilizadas como controle. A partir do segundo dia após a repicagem, foram realizadas avaliações a cada 24 horas, até que o controle atingisse a borda da placa (8 dias). Com estas avaliações calculou-se o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e a inibição do crescimento micelial (ICM).

O cálculo do IVCM, expresso em cm.dia^{-1} , foi realizado segundo proposto por Gomes (2008), por meio da seguinte fórmula:

$$\text{IVCM} = \sum (D - D_a) / N$$

Onde:

D: Diâmetro médio atual

Da: Diâmetro médio anterior

N: número de dias após a inoculação

O crescimento micelial foi obtido pela medida do diâmetro das colônias em dois sentidos perpendiculares, com o auxílio de um escalímetro. Com os dados obtidos, foi determinada a área de crescimento micelial para cada tratamento, e realizado os cálculos de

percentuais de inibição do crescimento micelial (ICM), utilizando a fórmula proposta por Bastos (1997).

$$\text{ICM} = \frac{(\text{Cresc. Controle} - \text{Cresc. Tratamento})}{\text{Cresc. Controle}} \times 100$$

Trinta dias após a repicagem foi avaliada a esporulação fúngica obtendo-se uma solução pelo acréscimo de 10 mL de água destilada nas placas de Petri com o crescimento fúngico e posteriormente, feita uma raspagem superficial do meio de cultura com a colônia fúngica separando o micélio do meio de cultura para liberação dos esporos. A suspensão foi filtrada em gaze, com o auxílio de um funil de vidro e retirada em um béquer. Desta solução foi coletado um mL, adicionada uma gota (200 µL) de Tween 20 e após agitação (10 segundos), a solução foi depositada em câmara de Neubauer, para a contagem do número de esporos e calculado a porcentagem da inibição da esporulação (PIE):

$$\text{PIE} = \frac{(\text{Esporulação Controle} - \text{Esporulação Tratamento})}{\text{Esporulação Controle}} \times 100$$

Para cada tratamento foram feitas cinco repetições, onde cada placa representou uma repetição. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANAVA), quando significativa, as médias foram comparadas pelo teste Scott-Knott, com nível de significância de 5%. As análises foram realizadas com o auxílio do programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011).

3.2 Síntese de proteínas e indução de respostas de defesa dos extratos brutos aquosos e produtos comerciais à *Diplocarpon rosae*

O disco de micélio de *D. rosae* crescido em meio BDA foi repicado para erlenmeyers contendo 50 mL de meio líquido batata-dextrose (BD), onde foram adicionados os tratamentos: EBA de folhas de *R. officinalis*, EBA de caules de *E. arvense*, EBA de sementes de *M. oleifera*, todos nas concentrações de 1%, produtos comerciais a base de extratos vegetais fermentados, fosfito de potássio, extratos de óleos vegetais, nas concentrações de 0,01% acrescidos de 0,0025% de adjuvante, Ecolife® (0,01%), fungicida a base de Tiofanato metílico (0,007%), adjuvante (0,0025%) e somente meio BD (controle).

O material foi mantido em câmara de germinação tipo B.O.D. a 25°C com fotoperíodo de 12 horas, por 20 dias e agitado duas vezes ao dia. Posteriormente, o micélio foi filtrado em gaze lavado em água destilada por três vezes e transferido para solução de sacarose 0,2 M (30 mL) por uma hora. O micélio foi retirado da solução, pesado em balança analítica e utilizado para a quantificação de proteínas solúveis totais e enzimas (peroxidase e catalase).

3.2.1 Síntese de proteínas

Para a extração de proteínas, parte do micélio previamente pesado, foi macerado em nitrogênio líquido, adicionado tampão fosfato de potássio, pH 7,5, a 100 mM contendo 1 mM de EDTA. O material obtido foi centrifugado a 4°C durante 30 minutos a 15000 g, considerado o sobrenadante como extrato protéico. Para a quantificação de proteínas totais, com agitação, uma alíquota de 2,5 mL do reagente de Bradford foi adicionada a 50 µL de extrato enzimático e incubado por cinco minutos. Em seguida foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 595 nm. Como branco foi utilizado 50 µL de água destilada com 2,5 mL de Bradford. A curva padrão foi determinada utilizando albumina de soro bovino (ABS).

O delineamento utilizado foi inteiramente ao acaso, utilizando 5 repetições por tratamento.

3.2.2 Obtenção do extrato enzimático

O extrato enzimático foi obtido de partes do micélio triturados em almofariz, utilizando nitrogênio líquido. Posteriormente foi feita a homogeneização em 4 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0) contendo 0,1 mM de EDTA e adicionado 1% de polivinilpirrolidona (PVP). O extrato obtido foi centrifugado a 9000 g durante trinta minutos a 4°C, sendo o sobrenadante considerado extrato enzimático e armazenado em freezer a - 20°C para determinação do conteúdo de proteínas totais, atividade específica das enzimas peroxidase e catalase.

3.2.3 Atividade específica de peroxidase do guaiacol

A atividade específica de peroxidase foi determinada pela medida da conversão do guaiacol em tetraguaiacol em 470 nm (LUSSO e PASCHOLATI, 1999). Misturou-se 100 µL do extrato enzimático micélio e 2,9 mL de substrato (solução de 250 µL de guaiacol e 306 µL de peróxido de hidrogênio em 100 mL de tampão fosfato 0,01M (pH 6,0). Para a referência foi utilizado uma cubeta contendo 3 mL da solução de guaiacol e peróxido de hidrogênio em tampão fosfato. A atividade específica da peroxidase foi determinada por um período de 2 minutos. Os resultados foram expressos em unidades de absorvância $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína.

3.2.4 Atividade específica de catalase

A atividade específica de catalase foi obtida através do método de Tomankova et al. (2006), pelo complexo estável formado pelo molibdato de amônio com peróxido de hidrogênio. 100 µL do extrato enzimático (micélio) foi incubado em 500 µL de mistura de reação contendo peróxido de hidrogênio em tampão fosfato de potássio 60 mM pH 7,4 a 38°C por 4 min. Após 4 minutos de incubação foi realizada a adição de 500 µL de 32,4 mM de molibdato de amônio. Em espectrofotômetro em comprimento de onda de 405 nm foi realizado a determinação do consumo de peróxido de hidrogênio pela catalase presente no extrato. O controle foi preparado para cada amostra através da adição de molibdato de amônio a mistura de reação, omitindo o período de incubação. A diferença entre a absorvância do branco e a amostra incubada indicou a quantidade de peróxido de hidrogênio utilizado pela enzima. A concentração de H_2O_2 , foi determinada utilizando-se o coeficiente de extinção $\epsilon = 0,0655 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e expresso em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

3.3 Ensaios em casa de vegetação

O experimento foi realizado em casa de vegetação (15 m x 7 m) localizada no Campus da Faculdade Ingá e no Laboratório de controle Alternativo e Indução de Resistência, pertencente ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá. O clima da região é do grupo Cfa, classificado como subtropical úmido mesotérmico (KÖPPEN-GEIGER, 1948).

O período de realização do experimento foi de Novembro de 2014 a Abril de 2015. As médias mensais de precipitação e temperatura durante o experimento estão na Tabela 1.

Tabela 1: Médias mensais de precipitação pluvial e temperatura no período de condução do experimento no município de Maringá, PR.

Mês	Ano	Precipitação (mm)	Temperatura (°C)
Novembro	2014	149,2	25,9
Dezembro	2014	239,2	26,4
Janeiro	2015	236,0	27,3
Fevereiro	2015	214,3	25,9
Março	2015	307,2	25,4
Abril	2015	91,4	24,8

Fonte: Estação climatológica da Universidade Estadual de Maringá.

A análise de solo foi realizada com coleta de 3 subamostras na profundidade de 0-20 cm, em toda a área experimental, as características químicas estão apresentadas no Apêndice A. A rosa por se tratar de uma cultura exigente em água, depende da intensidade e frequência de irrigação, durante a manutenção da cultura a irrigação utilizada foi por gotejamento com vazão de $1\text{L}^{-1}\text{ hora}^{-1}\text{ planta}^{-1}$, sendo as plantas irrigadas diariamente durante uma hora.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados com 10 tratamentos, 8 blocos e duas plantas constituindo uma parcela.

3.3.1 Obtenção das plantas de roseiras

As mudas com 50 dias após o enxerto das roseiras variedade ‘Grand Gala’ de coloração vermelha foram adquiridas com produtor da região de Marialva, PR, foram selecionadas e transplantadas no solo em casa de vegetação de 105 m^2 , com espaçamento de $0,25 \times 1,40\text{ m}$. No início do experimento, após o transplante, foi realizada uma adubação a base de esterco de caprinos, com cerca de 500 g por planta. Durante o período de condução do experimento também foram realizadas podas de manutenção e tutoramento das plantas.

3.3.2 Obtenção dos extratos

Os extratos vegetais de *R. officinalis* e *E. arvensis* foram obtidos das folhas de plantas frescas e o extrato vegetal de moringa, foi obtido de sementes retiradas das cápsulas secas da espécie *M. oleifera*. Para a obtenção dos extratos brutos aquosos (EBA) foram utilizadas 50 g

de folhas de *R. officinalis*, trituradas em 500 mL de água destilada por 2 min (concentração a 10%), em liquidificador e em seguida filtrada em gaze. O mesmo procedimento foi feito para a obtenção do EBA de *E. arvense* e de *M. oleifera*.

Produtos comerciais à base de extratos vegetais fermentados de fosfito de potássio e de extratos de óleos vegetais foram utilizados na concentração de 0,1% do produto com adição de 0,025% de adjuvante. O produto Ecolife® a 0,1%, fungicida (Tiofanato metílico) a 0,07%, adjuvante a 0,025% e água destilada (testemunha).

Durante a condução do experimento foram realizadas quatro aplicações dos tratamentos, no final da tarde, com intervalos de 10 dias, onde as plantas foram tratadas sobre forma de aspersão, com soluções via foliar. As avaliações realizadas foram: incidência e severidade da doença, produtividade e biometria das rosas, determinação do teor de clorofila e quantificações enzimáticas.

3.3.3 Incidência

A incidência foi determinada pela presença e ausência de folhas com sintomas da doença pinta preta (*D. rosae*), que ocorreram naturalmente sem a necessidade de inoculação, nas plantas avaliadas a cada 5 dias, e posteriormente submetidas a fórmula:

$$\% \text{ Incidência: } (N^{\circ} \text{ de plantas infectadas} / N^{\circ} \text{ total de plantas}) \times 100.$$

3.3.4. Severidade

A avaliação da severidade foi iniciada a partir da observação dos primeiros sintomas da doença nas plantas, atribuindo notas de severidade, utilizando escala diagramática adaptada da mancha alvo da soja (Soares et al., 2009) (Anexo). A severidade foi avaliada na porção mediana das plantas, em duas folhas de cada planta da parcela, identificadas com fitilho.

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

$$\text{AACPD} = \sum (y_i + y_{i+1}) / 2 * (t_{i+1} - t_i)$$

Onde:

n = número de avaliações;

y = severidade da doença (%);

t = tempo (dias).

No total foram realizadas cinco avaliações de severidade e incidência com intervalos de cinco dias.

No critério de classificação de rosa de corte a respeito da qualidade, segundo a Cooperativa Veiling Holambra (2015), as rosas são divididas em duas categorias (A1 e A2) sendo estabelecida conforme limites de tolerância para defeitos graves e leves. Para os danos de pinta preta a categoria A1 refere-se a uma leve intensidade sem comprometer a beleza do produto, já a A2, moderada intensidade sem comprometer a beleza do produto. Cabe ao produtor selecionar e eliminar os defeitos antes de embalar o produto, assegurando os requisitos mínimos de qualidade.

3.3.5 Produtividade

Para avaliar a produtividade foi realizada a contagem dos números de botões florais por planta, durante dois ciclos após o início da condução do experimento, aos 40 e 80 dias. Foram utilizadas duas plantas por repetição.

3.3.6 Biometria

Para a classificação biométrica foram determinadas as seguintes variáveis: comprimento de haste, comprimento de botão e diâmetro de haste, com auxílio de fita métrica e paquímetro digital. Foram utilizadas duas hastes florais por repetição.

O comprimento de haste foi determinado a partir da base da haste até a ponta do botão; o diâmetro da haste foi determinado na metade do comprimento da haste e o comprimento do botão foi determinado pela distância entre a base da pétala até a ponta do botão.

As hastes foram classificadas de acordo com o padrão criado pela Cooperativa Veiling Holambra (Tabela 2).

Tabela 2: Classificação do comprimento de botão, comprimento de haste e espessura de haste para rosas de corte

Classe	Comp. botão (cm)	Comp. haste (cm)	Esp. haste (mm)
30	Mínimo de 3,5	25 a 30	Mínimo de 3
40	Mínimo de 3,5	35 a 40	Mínimo de 4
50	Mínimo de 4,5	45 a 50	Mínimo de 5
60	Mínimo de 4,5	55 a 60	Mínimo de 5
70	Mínimo de 4,5	65 a 70	Mínimo de 5
80	Mínimo de 4,5	75 a 80	Mínimo de 5

Fonte: Critério de classificação – Rosas de corte, Veiling Holambra, 2015.

3.3.7 Determinação do teor de clorofila

Após 25 e 40 dias da primeira aplicação dos tratamentos, foram retirados dois discos de folhas com 2 mm de diâmetro para a quantificação dos teores de clorofila. A metodologia utilizada foi adaptada de Arnon (1949). As amostras de tecido vegetal foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar contendo 5 mL de acetona 80%, durante 7 dias no escuro a 25°C. Após esse período foi realizada leitura em espectrofotômetro a 663 nm e 645 nm para clorofila *a* e *b*, respectivamente. A determinação do teor de clorofila *a* foi realizada pela fórmula $(0,0127.A663)-(0,00269.A645)$ e clorofila *b* pela fórmula $(0,0229.A645)-(0,00468.A663)$. O teor de clorofila total foi obtido pela soma dos resultados dos conteúdos de clorofila *a* e *b* e os valores expressos em mg g^{-1} tecido fresco.

3.4 Análises bioquímicas

O estudo de indução de resistência em roseiras tratadas com produtos naturais e comerciais foi realizado pelas análises da atividade específica de peroxidase do guaiacol, catalase e polifenoloxidase.

3.4.1 Coleta das amostras e obtenção do extrato enzimático

Para as análises bioquímicas foram coletadas folhas da parte mediana das roseiras, às 24 h antes e 24 h após a aplicação dos tratamentos, totalizando 4 aplicações e 5 coletas. As folhas foram pesadas e armazenadas em freezer a - 20°C.

Para a obtenção do extrato enzimático, as folhas foram trituradas em almofariz, utilizando nitrogênio líquido. Posteriormente foi feita a homogeneização em 4 mL de tampão

fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0) contendo 0,1 mM de EDTA e adicionado 1% de polivinilpirrolidona (PVP). O extrato obtido foi centrifugado a 15000 g durante 30 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante considerado extrato enzimático e armazenado em freezer a - 20°C para determinação do conteúdo de proteínas totais, atividade específica das enzimas peroxidase, catalase e polifenoloxidase.

3.4.2 Determinação de proteínas totais

Para a quantificação de proteínas totais, foi utilizada a metodologia segundo Bradford (1976), onde uma alíquota de 50 µL do extrato enzimático foi adicionada a 2,5 mL do reagente Bradford, em agitação e incubado a cinco minutos. Em seguida foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 595 nm. Como branco foi utilizado 50 µL de água destilada com 2,5 mL de Bradford. A curva padrão foi determinada utilizando albumina de soro bovino (ABS).

3.4.3 Determinação da atividade específica de peroxidase do guaiacol

A atividade específica de peroxidase foi determinada pela medida da conversão do guaiacol em tetraguaiacol em 470 nm (LUSSO; PASCHOLATI, 1999). Foi misturado 100 µL do extrato enzimático conforme descrito acima e 2,9 mL de substrato (solução de 250 µL de guaiacol e 306 µL de peróxido de hidrogênio em 100 mL de tampão fosfato 0,01M (pH 6,0), mantido a 30°C. Para a referência foi utilizado uma cubeta contendo 3 mL da solução de guaiacol e peróxido de hidrogênio em tampão fosfato. A atividade específica da peroxidase foi determinada por um período de 2 minutos. Os resultados foram expressos em unidades de absorvância $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína.

3.4.4 Determinação da atividade específica de catalase

A atividade específica de catalase foi obtida através do método de Tomankova et al. (2006), pelo complexo estável formado pelo molibdato de amônio com peróxido de hidrogênio. 100 µL do extrato enzimático conforme descrito acima foi incubado em 500 µL de mistura de reação contendo 60 mM de peróxido de hidrogênio em tampão fosfato de potássio 60 mM pH 7,4 a 38°C por 4 min. Após 4 minutos de incubação foi realizada a adição

de 500 μL de 32,4 mM de molibdato de amônio. A leitura foi em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 405 nm determinando o consumo de peróxido de hidrogênio pela catalase presente no extrato. O branco foi preparado para cada amostra através da adição de molibdato de amônio a mistura de reação, omitindo o período de incubação. A diferença entre a absorbância do branco e a amostra incubada indicou a quantidade de peróxido de hidrogênio utilizado pela enzima. A concentração de H_2O_2 , foi determinada utilizando-se o coeficiente de extinção $\epsilon = 0,0655 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e expresso em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

3.4.5 Determinação da atividade específica de polifenoloxidase

A atividade específica da enzima polifenoloxidase foi determinada utilizando a metodologia de Duangmal e Apenten (1999). Foi realizada a quantificação da oxidação do catecol convertido em quinona, reação esta, mediada pela enzima polifenoloxidase. O substrato composto por catecol, na concentração de 0,02 mM, foi dissolvido em tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 6,8), mantido a 30°C por 30 minutos. Posteriormente foi misturado 900 μL do substrato e 100 μL do extrato enzimático (descrito acima), e realizado a leitura em espectrofotômetro, a 420 nm, por um período de 2 minutos. Os resultados foram expressos em absorbância $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

3.5 Análise estatística

Para os ensaios em casa de vegetação utilizou-se o delineamento experimental em blocos ao acaso, com 8 repetições. Os dados foram submetidos aos testes de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk ($p < 0,05$). As variáveis que não atenderam os pressupostos de normalidade, como a severidade e as atividades enzimáticas, foram transformadas pela raiz quadrada. Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância, observados e comparados pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Fungitoxicidade *in vitro*

Os resultados referentes a fungitoxicidade *in vitro* para o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), inibição do crescimento micelial (ICM), esporulação e inibição da esporulação, estão representados na Tabela 3.

Os tratamentos que promoveram maior controle *in vitro* do fitopatógeno *D. rosae* em relação ao IVCM e ICM quando comparado a testemunha, foi o Tiofanato metílico (T8), seguido do produto comercial a base de óleos vegetais (T6), EBA de *R. officinalis* (T1), produto comercial a base de fosfito de potássio (T5) e Ecolife® (T7), reduzindo em 100, 56, 34, 34, e 28% o crescimento micelial, respectivamente.

Insenberg e Nozaki (2013) obtiveram resultados semelhantes no controle *in vitro* de *D. rosae* sobre diferentes concentrações de óleo essencial de alfavaca (*Ocimum basilicum*), verificando que o óleo inibiu o crescimento micelial do fungo nas concentrações acima de 10 µL. Itako et al. (2009) também verificaram a redução de 49,06% do crescimento micelial de *Cladosporium fulvum* em relação a testemunha utilizando extrato aquoso de alecrim na concentração de 40%. Caixeta et. al (2012) estudando os efeitos do fosfito de potássio sobre fungos patogênicos do feijoeiro, verificaram a ação inibitória do fosfito de potássio nas doses de 0,125; 0,25 e 0,5 µL mL⁻¹ sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum lindemuthianum*. Camatti-Sartori et al. (2011), verificando a atividade de extratos vegetais sobre fungos de flores, observou que extratos acéticos a 25 e 50% e etanólicos a 50% de *E. arvense* inibiram o desenvolvimento micelial de *Botrytis* sp. em mais de 50%.

Observou-se que os tratamentos com produto comercial a base de extratos vegetais fermentados, adjuvante e EBA de *E. arvense* também diferiram estatisticamente da testemunha, reduzindo parcialmente em 22, 19 e 11% o crescimento do patógeno e apenas o EBA de *M. oleifera*, não diferiu.

Tabela 3: Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), inibição do crescimento micelial (ICM), esporulação e inibição da esporulação do fungo *Diplocarpon rosae* submetidos aos diferentes tratamentos

Tratamento	IVCM (cm dia ⁻¹)	ICM (%)	Esporul.(x10 ⁴)	Inib. da esporul.(%)
T1	0,73 c	34,52 c	1,00 d	5,00 c
T2	0,88 e	11,41 f	0,15 a	81,66 a
T3	0,95 f	0,00 g	0,80 d	11,66 c
T4	0,81 d	22,72 e	0,20 a	75,00 a
T5	0,75 c	34,08 c	0,40 b	49,99 b
T6	0,60 b	56,54 b	0,40 b	53,33 b
T7	0,78 c	28,26 d	0,55 c	35,00 c
T8	0,00 a	100,00 a	0,00 a	100,00 a
T9	0,82 d	19,51 e	0,75 d	15,00 c
T10	0,94 f	0,00 g	0,85 d	0,00 c
CV (%)	4,64	13,21	36,43	44,34

Tratamentos: T1: EBA (1%) *Rosmarinus officinalis*, T2: EBA (1%) de *Equisetum arvense*, T3: EBA (1%) de *Moringa oleifera*, T4: Produto comercial a base de extratos vegetais fermentados (0,01%), T5: Produto comercial a base de fosfito de potássio (0,01%), T6: Produto comercial a base de óleos vegetais (0,01%), T7: Ecolife® (0,01%), T8: Tiofanato metílico (0,007%), T9: Adjuvante (0,0025%), T10: BDA.

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste Scott-Knott (P<0,005).

Os esporos são unidades reprodutivas e infectivas dos fungos fitopatogênicos responsáveis por produzir propágulos que se disseminam e infectam a planta. Assim, quanto maior a inibição da formação de esporos, mais eficiente é o produto. Na Tabela 3 observa-se que os tratamentos com EBA de *Equisetum arvense* (T2) e produto comercial a base de extratos vegetais fermentados (T4), inibiram a esporulação do fitopatógeno *D. rosae* constatando efeito anti-esporulante, e também estatisticamente não diferiram do fungicida Tiofanato metílico (T8).

Os tratamentos com produto comercial a base de fosfito de potássio (T5) e produto comercial a base de óleos vegetais (T6) também reduziram significativamente a esporulação de *D. rosae* em relação a testemunha (T10), inibindo 49 e 53% a esporulação. Semelhantemente alguns trabalhos utilizando fosfito e óleos vegetais mostraram resultados promissores no controle de fungos. Caixeta et al. (2012), verificaram ainda que o fosfito de potássio nas doses 0,125 µL mL⁻¹, 0,25 µL mL⁻¹ e 0,5 µL mL⁻¹ reduziram significativamente a esporulação do fungo *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*.

Insenberg e Nozaki (2013) também verificaram que o óleo essencial de *O. basilicum* inibiu parcialmente a produção de esporos nas concentrações de 2,5 µL e 5 µL. Os

tratamentos com EBA de *R. officinalis* (T1), EBA de *M. oleifera* (T3) e adjuvante (T9) não diferiram estatisticamente da testemunha (T10).

Considerando a inibição da esporulação de *D. rosae*, os tratamentos estudados podem ser divididos em 2 grupos com relação a eficiência: Grupo 1: fungicida Tiofanato metílico, EBA de *E. arvense* e produto comercial a base de extratos vegetais fermentados; Grupo 2: produto comercial a base de fosfito de potássio e produto comercial a base de óleos vegetais.

4.2 Estudos sobre a síntese de proteínas e indução de respostas de defesa dos extratos brutos aquosos e produtos comerciais à *Diplocarpon rosae*

4.2.1 Síntese de proteína

O efeito dos tratamentos sobre a síntese de proteínas no micélio de *D. rosae* está representado na Figura 1, onde pode-se observar o aumento na concentração de proteínas totais no micélio de *D. rosae* em comparação a testemunha nos tratamentos com EBA de *R. officinalis* (T1), EBA de *E. arvense* (T2), EBA de *M. oleifera* (T3), produto comercial a base de óleos vegetais (T6) e Ecolife® (T7), com 0,4; 0,8; 0,6; 0,4 e 0,6 vezes mais proteínas totais do que a testemunha (BD –T10).

O fungo pode ter utilizado o meio com os EBAs e o óleo vegetal, como fonte de alimento e energia para seu crescimento, o que pode ter causado o aumento de proteínas totais. Roma (2013) estudando o mecanismo de ação do fosfito de potássio a *Rhizopus stolonifer*, verificou incremento na síntese de proteína em concentrações crescentes do produto (5 e 10 mL L⁻¹).

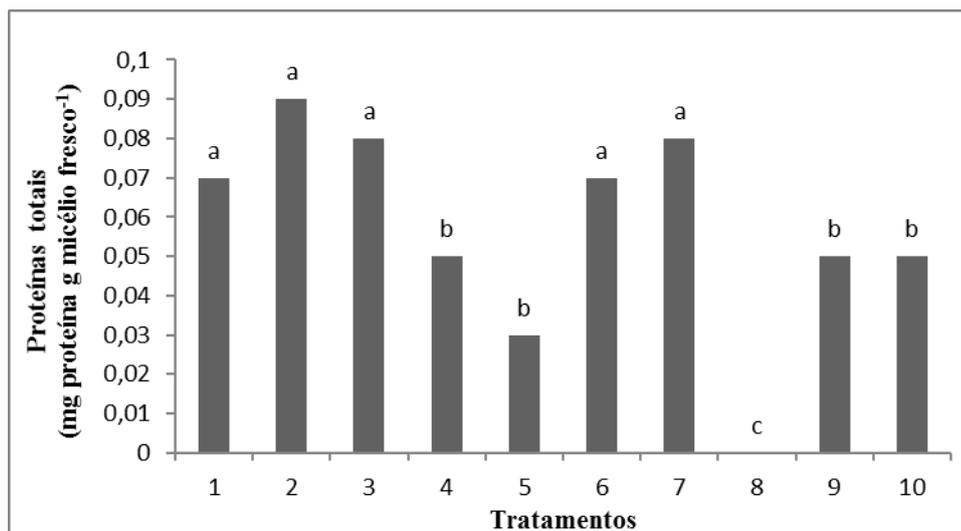


Figura 1: Efeito dos tratamentos sobre a síntese de proteínas no micélio de *Diplocarpon rosae* cultivado em meio líquido batata-dextrose (BD), após 20 dias.

Tratamentos: T1: EBA (1%) *Rosmarinus officinalis*, T2: EBA (1%) de *Equisetum arvense*, T3: EBA (1%) de *Moringa oleifera*, T4: Produto comercial a base de extratos vegetais fermentados (0,01%), T5: Produto comercial a base de fosfito de potássio (0,01%), T6: Produto comercial a base de óleos vegetais (0,01%), T7: Ecolife® (0,01%), T8: Tiofanato metílico (0,007%), T9: Adjuvante (0,0025%), T10: BD.

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste Scott-Knott ($P < 0,005$). Cv (%): 37,38.

4.2.2 Efeito sobre a indução de resposta de defesa

Os fitopatógenos também podem ser expostos aos efeitos das espécies ativas de oxigênio que são liberados das plantas, sendo uma resposta inicial de defesa da interação patógeno/hospedeiro. Buscando verificar um possível estresse oxidativo causado em *D. rosae* em função da exposição aos tratamentos foi determinada a atividade específica das enzimas peroxidase e catalase.

Em relação a atividade específica de peroxidase de guaiacol em micélio de *D. rosae*, representada na Figura 2, pode-se observar o aumento da enzima peroxidase apenas no tratamento com EBA de *R. officinalis* (T1) sendo 0,64 vezes maior que a testemunha. Os demais tratamentos não diferiram da testemunha BD (T10).

Os fungos produzem enzimas que hidrolisam o substrato tornando-o assimilável, possivelmente o EBA de *R. officinalis* esteja agindo como fonte de carbono e energia levando ao maior crescimento micelial de *D. rosae*.

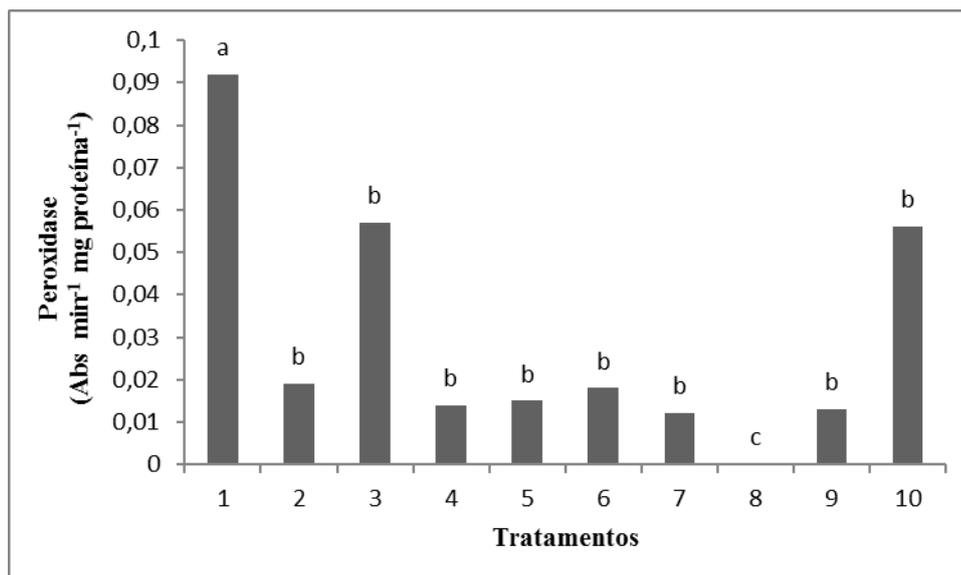


Figura 2: Atividade específica de peroxidase em micélio de *Diplocarpon rosae*, cultivado em meio BD contendo diferentes tratamentos, após 20 dias.

Tratamentos: T1: EBA (1%) *Rosmarinus officinalis*, T2: EBA (1%) de *Equisetum arvense*, T3: EBA (1%) de *Moringa oleifera*, T4: Produto comercial a base de extratos vegetais fermentados (0,01%), T5: Produto comercial a base de fosfito de potássio (0,01%), T6: Produto comercial a base de óleos vegetais (0,01%), T7: Ecolife® (0,01%), T8: Tiofanato metílico (0,007%), T9: Adjuvante (0,0025%), T10: BD.

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste Scott-Knott ($P < 0,005$). Cv (%):80,3.

Em relação a atividade da enzima catalase em micélio de *D. rosae* (Figura3), pode-se observar que o tratamento com produto comercial a base de fosfito de potássio (T5) teve maior atividade da enzima sendo 1,38 vezes maior que a testemunha.

As enzimas antioxidativas são importantes na proteção contra as EAOs geradas durante o metabolismo celular normal. Esse processo de detoxificação é necessário em fitopatógenos contra os oxidantes liberados pela planta como resposta primaria de defesa. O aumento da atividade da peroxidase e catalase com a presença dos tratamentos pode ter desencadeado a formação de H_2O e O_2 , pois são enzimas responsáveis pela eliminação dessas EAOs.

Fialho et al. (2014) estudaram a resposta antioxidativa do fungo causador da pinta preta em citrus (*Guignardia citricarpa*) através de compostos voláteis produzidos por *Saccharomyces cerevisiae*. Observaram aumento na atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase nas primeiras 24 a 48 h de exposição aos compostos voláteis orgânicos, causando estresse oxidativo nos microorganismos.

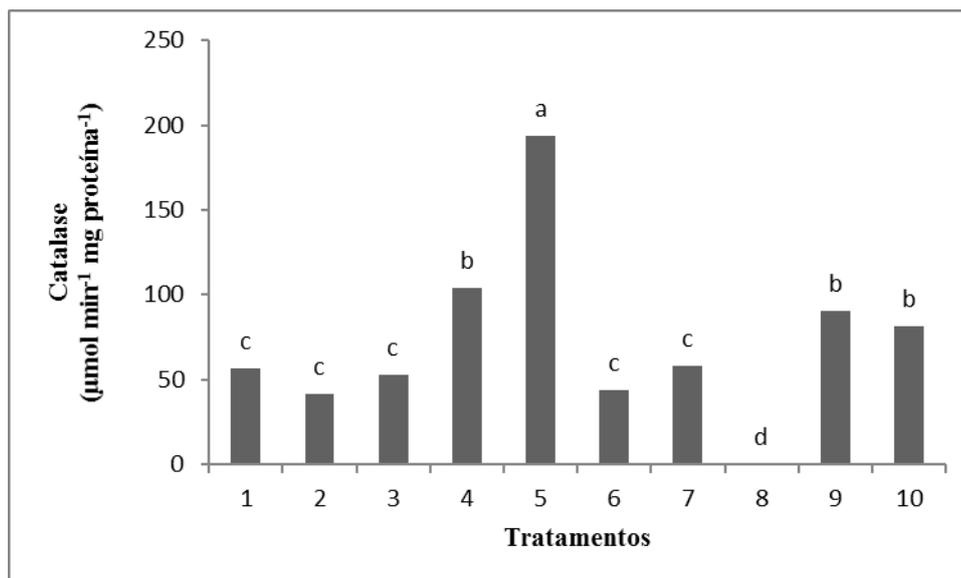


Figura 3: Atividade específica de catalase em micélio de *Diplocarpon rosae*, cultivado em meio BD contendo diferentes tratamentos, após 20 dias.

Tratamentos: T1: EBA (1%) *Rosmarinus officinalis*, T2: EBA (1%) de *Equisetum arvense*, T3: EBA (1%) de *Moringa oleifera*, T4: Produto comercial a base de extratos vegetais fermentados (0,01%), T5: Produto comercial a base de fosfito de potássio (0,01%), T6: Produto comercial a base de óleos vegetais (0,01%), T7: Ecolife® (0,01%), T8: Tiofanato metílico (0,007%), T9: Adjuvante (0,0025%), T10: BD.

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste Scott-Knott ($P < 0,005$). Cv (%): 48,3.

4.3 Experimento em casa de vegetação

4.3.1 Incidência e severidade

A incidência e a severidade da doença pinta preta em roseiras pode ser observada na Tabela 4. Pela análise estatística pode-se observar que tanto a incidência da doença nas roseiras variedade Grand Gala, durante o período de avaliação como a severidade da doença (AACPD), não diferiram significativamente entre si. Fatores como a alta frequência de precipitações (206 mm em média) na área durante o período de realização do experimento, relacionado com altas temperaturas (25,9°C em média) podem explicar tais valores (Tabela 1) e (Apêndice B).

Tabela 4: Incidência de doença (%) e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em roseiras após a aplicação dos tratamentos

Tratamento	Incidência de doença (%) - dias de avaliação								AACPD*
	1*	6*	12*	17*	23*	29*	35*	41*	
T1	75,0	62,5	93,7	100,0	81,2	81,2	93,7	100,0	1,59
T2	62,5	62,5	93,7	81,2	75,0	81,2	93,7	100,0	1,15
T3	93,7	93,7	100,0	100,0	93,7	93,7	75,0	100,0	1,48
T4	81,2	75,0	81,2	75,0	68,7	75,0	93,7	100,0	1,53
T5	68,7	75,0	87,5	75,0	87,5	81,2	81,2	93,7	1,29
T6	93,7	75,0	100,0	93,7	81,2	81,2	68,7	100,0	1,19
T7	37,5	56,2	81,2	68,7	75,0	50,0	75,0	93,7	1,41
T8	68,7	93,7	87,5	93,7	87,5	87,5	100,0	93,7	1,45
T9	81,2	87,5	93,7	93,7	81,2	93,7	100,0	100,0	1,08
T10	81,2	68,7	81,2	81,2	87,5	81,2	87,5	100,0	1,42
CV (%)	45,9	42,3	25,0	28,7	40,3	39,4	28,3	10,0	19,67

Tratamentos: T1: EBA (10%) *Rosmarinus officinalis*, T2: EBA de *Equisetum arvense* (10%), T3: EBA de *Moringa oleifera* (10%), T4: Produto comercial a base de extratos vegetais fermentados (0,1%), T5: Produto comercial a base de fosfito de potássio (0,1%), T6: Produto comercial a base de óleos vegetais (0,1%), T7: Ecolife® (0,1%), T8: Tiofanato metílico (0,07%), T9: Adjuvante (0,025%), T10: Água destilada.

*ns = não significativo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Poucos trabalhos foram encontrados relatando o efeito de extratos e óleos essenciais no controle de doenças em roseiras. Entretanto, Wojdyła (2000), estudando a atividade extrato de toranja, nas concentrações de 0,017 a 0,099%, no controle do oídio e da pinta preta em rosas, verificou que o controle de oídio na concentração de 0,066% foi tão eficaz como triforina (padrão) aplicada a 0,027%. Já no controle de *D. rosae*, observou resultado menos eficaz do que o tratamento padrão. Este mesmo autor, em 2002, estudou a atividade de óleos de colza, sementes de girassol e óleo mineral (80 Atpolan CE) no controle de oídio em rosas cultivadas em estufa e observou que a eficácia dos óleos testados aumentou com as suas concentrações.

Wojdyła (2015) estudou os efeitos de óleos vegetais e minerais no desenvolvimento de oídio em rosas cultivadas em casa de vegetação. Verificou que os óleos de colza, girassol, Atpolan CE 80 e CE Sunspray 850 pulverizados duas vezes na planta em concentrações de 0,25%, 0,5%, 1,0% e 2%, mostraram eficácia no desenvolvimento do fungo, de 52% (CE Sunspray 850 a 0,25%) a 100% (80 Atpolan CE a 2%), para o óleo de colza a 1%, verificou que a eficácia variou de 76,4% a 100%.

4.3.2 Produtividade e biometria

Os critérios de padrão e qualidade da classificação para rosas de corte são desenvolvidos pelo departamento de qualidade da Cooperativa Veiling Holambra em conjunto com produtores e o departamento comercial. Os dados referentes à produtividade (número de botões florais) e a biometria (comprimento do botão floral, comprimento da haste e espessura da haste), das rosas na primeira colheita, aos 40 dias, estão representados na Tabela 5. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos realizados.

Tabela 5: Produtividade (número de botões) e biometria (comprimento de botão, comprimento de haste e espessura da haste) de rosas, na primeira colheita, aos 40 dias após a aplicação dos tratamentos

Tratamentos	Nº botões*	Comp. Botão* (cm)	Comp. haste* (cm)	Esp. haste* (mm)
1	4,00	3,80	33,06	3,88
2	4,00	4,22	36,06	3,31
3	4,00	3,53	37,21	3,05
4	4,00	5,05	38,37	3,57
5	4,00	4,54	36,19	3,45
6	4,00	4,78	33,00	3,42
7	4,00	3,68	31,56	3,44
8	4,00	4,24	34,81	3,71
9	4,00	4,36	33,87	3,29
10	4,00	4,16	36,50	3,44
CV (%)	28,95	31,96	19,79	18,92

Tratamentos: T1: EBA (10%) *Rosmarinus officinalis*, T2: EBA de *Equisetum arvense* (10%), T3: EBA de *Moringa oleifera* (10%), T4: Produto comercial a base de extratos vegetais fermentados (0,1%), T5: Produto comercial a base de fosfito de potássio (0,1%), T6: Produto comercial a base de óleos vegetais (0,1%), T7: Ecolife® (0,1%), T8: Tiofanato metílico (0,07%), T9: Adjuvante (0,025%), T10: Água destilada.

*ns = não significativo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Na segunda colheita, aos 80 dias (Tabela 6), foi novamente realizada as avaliações referentes a produtividade e biometria, sendo observado que não houve diferença estatística entre os tratamentos para o número de botões e comprimento de botão. Entretanto, as plantas tratadas com EBA de *R. officinalis* (T1) mantiveram o mesmo número de botões florais (4,0 botões florais por planta) e os demais tratamentos, reduziram este número em até 50% (2,0 botões florais por planta) no tratamento com EBA de *M. oleifera* (T3).

Para o comprimento de botões, apesar de não ser observada diferença estatística entre os tratamentos, segundo a classificação do comprimento de botão (Tabela 2), os mesmos se

encontram dentro dos padrões estabelecidos segundo o padrão da Cooperativa Veiling Holambra.

Em relação ao comprimento de haste, o tratamento com produto comercial a base de fosfito de potássio (T5) foi superior a testemunha em 31%, seguido dos tratamentos com EBA *R. officinalis* (T1) com 15%, produto comercial a base de extratos vegetais fermentados (T4) e produto comercial a base de óleos vegetais (T6) com 12%.

Os maiores valores de espessura da haste foram verificados nos tratamentos com produto comercial a base de extratos vegetais (T4), produto comercial a base de fosfito de potássio (T5) e produto comercial a base de óleos vegetais (T6), com 20, 29 e 20% de incremento da espessura, comparada a testemunha, respectivamente.

O fosfito de potássio pode ter atuado no metabolismo da planta de forma a estimular o seu desenvolvimento.

Tabela 6: Produtividade (número de botões) e biometria (comprimento de botão, comprimento de haste e espessura da haste), na segunda colheita aos 80 dias após a aplicação dos tratamentos

Tratamentos	N° botões*	Comp. botão* (cm)	Comp. haste (cm)	Esp. haste (mm)
1	4,00	5,73	48,75 b	3,34 b
2	3,00	4,47	40,77 c	3,52 b
3	2,00	6,07	40,47 c	3,51 b
4	3,00	5,75	47,43 b	3,86 a
5	3,00	6,15	55,40 a	4,17 a
6	3,00	6,06	47,31 b	3,87 a
7	3,00	5,75	45,84 b	3,63 b
8	3,00	5,69	37,45 c	3,50 b
9	3,00	5,81	45,12 b	3,54 b
10	3,00	5,75	42,25 c	3,21 b
CV (%)	41,42	17,91	16,39	12,17

Tratamentos: T1: EBA (10%) *Rosmarinus officinalis*, T2: EBA de *Equisetum arvense* (10%), T3: EBA de *Moringa oleifera* (10%), T4: Produto comercial a base de extratos vegetais fermentados (0,1%), T5: Produto comercial a base de fosfito de potássio (0,1%), T6: Produto comercial a base de óleos vegetais (0,1%), T7: Ecolife® (0,1%), T8: Tiofanato metílico (0,07%), T9: Adjuvante (0,025%), T10: Água destilada.

*ns = não significativo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

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

Segundo o critério de classificação para rosas de corte Veiling Holambra (Tabela 2) tanto o comprimento de botão, como o comprimento de haste e espessura de haste estão dentro dos padrões estabelecidos. Para o comprimento e espessura da haste a maioria dos valores estão na classe 30 e 40.

Aspectos como o investimento do plantio em casa de vegetação, apesar do investimento alto, possuem um retorno de lucratividade rápido e um ganho duradouro ao produtor, visto que apesar da ocorrência de doença houve diferença estatística entre os tratamentos, o que não comprometeu a produção.

4.3.3 Teor de clorofila

As clorofilas estão relacionadas com a eficiência fotossintética das plantas e consequentemente com seu crescimento, pois participam de processos na absorção de energia luminosa para posterior conversão dessa energia em ATP. Neste trabalho, não foram observadas diferenças estatísticas no teor de clorofila a, b e total em folhas de roseiras (Tabela 7) indicando que os tratamentos não interferiram na eficiência fotossintética das plantas.

Eshaghdatgar et al. (2013) estudaram os efeitos de extratos vegetais de plantas medicinais (*Stevia rebaudiana* e *Thymus vulgaris*) na dose de 0,1 e 0,2 ppm em rosas de corte "Dolce Vita", em pós-colheita e verificaram que extratos de stevia a 0,1 ppm acompanhado por 3% de sacarose + 4% de CaCl₂ retardou a degradação da clorofila durante a pós-colheita.

Tabela 7: Teores de clorofila a, b e total em roseiras, 25 e 40 dias após a aplicação dos tratamentos. Os valores estão expressos em mg⁻¹ tecido fresco.

Tratamentos	25 dias*			40 dias*		
	A	B	Total	A	B	Total
1	0,06	0,03	0,09	0,06	0,03	0,09
2	0,08	0,04	0,12	0,06	0,03	0,09
3	0,06	0,03	0,09	0,06	0,03	0,08
4	0,06	0,03	0,09	0,06	0,02	0,08
5	0,07	0,03	0,10	0,07	0,03	0,09
6	0,07	0,03	0,10	0,07	0,03	0,10
7	0,07	0,03	0,10	0,07	0,03	0,09
8	0,07	0,03	0,10	0,07	0,03	0,09
9	0,06	0,03	0,09	0,06	0,03	0,09
10	0,08	0,03	0,11	0,08	0,03	0,11
CV (%)	18,69	25,77	20,33	27,9	33,73	28,74

Tratamentos: T1: EBA (10%) *Rosmarinus officinalis*, T2: EBA de *Equisetum arvense* (10%), T3: EBA de *Moringa oleifera* (10%), T4: Produto comercial a base de extratos vegetais fermentados (0,1%), T5: Produto comercial a base de fosfito de potássio (0,1%), T6: Produto comercial a base de óleos vegetais (0,1%), T7: Ecolife® (0,1%), T8: Tiofanato metílico (0,07%), T9: Adjuvante (0,025%), T10: Água destilada.

*ns = não significativo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

4.4 Indução de mecanismos bioquímicos

As enzimas relacionadas a patogênese estão envolvidas nos processos de defesa durante a infecção do patógeno. As enzimas peroxidase e catalase estão relacionadas ao estresse oxidativo, já a polifenoloxidase e também a peroxidase estão envolvidas no processo de lignificação da parede celular.

Ao analisar a atividade de peroxidase de guaiacol (Tabela 8), os tratamentos com EBA de *M. oleifera*, produto comercial a base de óleos vegetais, Ecolife®, Tiofanato metílico e adjuvante tiveram aumento da atividade da enzima peroxidase com a primeira e a segunda aplicação. Para o tratamento com produto comercial a base de extratos vegetais a maior atividade da enzima foi na primeira aplicação. Nos demais tratamentos não houve diferença da atividade no decorrer das aplicações.

Na primeira aplicação somente o tratamento com produto comercial a base de fosfito de potássio diferiu da testemunha, nas demais aplicações os tratamentos não diferiram.

Ferraz e Cereda (2009) avaliaram o efeito de películas amiláceas de mandioca nas características químicas de hastes de rosas durante a pós-colheita, verificaram que a diminuição da peroxidase pode estar relacionada ao processo de senescência.

Tabela 8: Atividade específica da enzima peroxidase (absorbância $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína) em folhas de roseiras após aplicação dos tratamentos

Tratamentos	Antes da aplicação 0h	Aplicação 1 1 dia 24h	Aplicação 2 10 dias 24h	Aplicação 3 20 dias 24h	Aplicação 4 30 dias 24h
1	0,54 Aa	0,57 Ba	0,64 Aa	0,52 Aa	0,47 Aa
2	0,46 Aa	0,56 Ba	0,50 Aa	0,43 Aa	0,46 Aa
3	0,54 Aa	0,65 Ba	0,67 Aa	0,37 Ab	0,34 Ab
4	0,60 Aa	0,65 Ba	0,45 Ab	0,40 Ab	0,42 Ab
5	0,48 Ab	1,00 Aa	0,58 Ab	0,45 Ab	0,44 Ab
6	0,60 Aa	0,66 Ba	0,57 Aa	0,45 Ab	0,36 Ab
7	0,59 Aa	0,65 Ba	0,71 Aa	0,43 Ab	0,45 Ab
8	0,62 Aa	0,54 Ba	0,53 Aa	0,32 Ab	0,41 Ab
9	0,57 Aa	0,68 Ba	0,55 Aa	0,31 Ab	0,42 Ab
10	0,58 Aa	0,54 Ba	0,56 Aa	0,39 Aa	0,44 Aa
CV(%)	24,50	29,63	32,19	38,24	34,31

Tratamentos: T1: EBA (10%) *Rosmarinus officinalis*, T2: EBA de *Equisetum arvense* (10%), T3: EBA de *Moringa oleifera* (10%), T4: Produto comercial a base de extratos vegetais fermentados (0,1%), T5: Produto comercial a base de fosfito de potássio (0,1%), T6: Produto comercial a base de óleos vegetais (0,1%), T7: Ecolife® (0,1%), T8: Tiofanato metílico (0,07%), T9: Adjuvante (0,025%), T10: Água destilada.

Médias seguidas da mesma letra maiúsculas na coluna e minúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Para a atividade de catalase (Tabela 9) verificou-se que para o tratamento com EBA de *M. oleifera* (T3) e produto comercial a base de fosfito de potássio (T5) a maior atividade da enzima foi na primeira aplicação. Para a aplicação com produto comercial à base de extratos vegetais (T4), o maior aumento da atividade da enzima foi observado na quarta aplicação. Com a aplicação do Tiofanato metílico (T8) a maior atividade foi observada na primeira, terceira e quarta aplicação.

Os tratamentos com EBA de *M. oleifera* (T3) e produto comercial a base de fosfito de potássio (T5) diferiram da testemunha na primeira aplicação, porém com menor atividade da enzima, o que também pode ser observado na segunda aplicação com os tratamentos com EBA de *R. officinalis* (T1), produto comercial a base de extratos vegetais (T4), produto comercial a base de óleos vegetais (T6), Ecolife® (T7) e Tiofanato metílico (T8).

Promyou et al. (2012) testando o ácido salicílico em antúrios observou aumento da enzima catalase e concluíram que o ácido salicílico resultou em melhor desintoxicação de compostos reativos de oxigênio e em melhor manutenção da integridade da membrana, durante o armazenamento a baixa temperatura.

De maneira geral, em relação as maiores atividades enzimáticas, os resultados demonstraram que os níveis da enzima catalase são maiores que os das peroxidases. Isso pode ser explicado pelo fato dessas duas enzimas competirem pelo mesmo sítio ativo, a degradação do peróxido de hidrogênio. As plantas podem ter sofrido um estresse oxidativo após o reconhecimento do patógeno, o que resultou em maiores níveis da enzima catalase, e menores de peroxidase, pois ambas convertem o H_2O_2 em H_2O e O_2 .

Tabela 9: Atividade específica da enzima catalase ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína) em folhas de roseiras após aplicação dos tratamentos

Tratamentos	Antes da aplicação 0h	Aplicação 1 1 dia 24h	Aplicação 2 10 dias 24h	Aplicação 3 20 dias 24h	Aplicação 4 30 dias 24h
1	3,45 Aa	3,59 Ba	2,89 Ba	3,82 Aa	3,85 Aa
2	3,38 Aa	3,37 Ba	3,79 Aa	4,32 Aa	4,11 Aa
3	3,83 Ab	5,08 Aa	4,02 Ab	4,33 Ab	4,24 Ab
4	4,03 Aa	3,75 Bb	3,11 Bb	3,69 Ab	4,57 Aa
5	4,09 Ab	5,36 Aa	4,31 Ab	4,59 Ab	4,09 Ab
6	3,16 Aa	3,34 Ba	3,17 Ba	3,82 Aa	3,31 Aa
7	3,57 Aa	3,92 Ba	3,63 Ba	4,04 Aa	4,11 Aa
8	3,61 Ab	3,94 Ba	3,09 Bb	4,46 Aa	4,16 Aa
9	3,37 Aa	3,22 Ba	3,40 Ba	4,16 Aa	3,67 Aa
10	3,33 Aa	3,49 Ba	3,93 Aa	3,75 Aa	3,90 Aa
CV(%)	15,54	23,93	21,97	23,23	16,30

Tratamentos: T1: EBA (10%) *Rosmarinus officinalis*, T2: EBA de *Equisetum arvense* (10%), T3: EBA de *Moringa oleifera* (10%), T4: Produto comercial a base de extratos vegetais fermentados (0,1%), T5: Produto comercial a base de fosfito de potássio (0,1%), T6: Produto comercial a base de óleos vegetais (0,1%), T7: Ecolife® (0,1%), T8: Tiofanato metílico (0,07%), T9: Adjuvante (0,025%), T10: Água destilada.

Médias seguidas da mesma letra maiúsculas na coluna e minúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

A polifenoloxidase é responsável pela catálise da reação de oxidação de polifenóis transformando-os em quinonas, que são compostos de ação antimicrobiana. Pode atuar no processo de oxidação dos compostos fenólicos e também participar do processo de lignificação da parede celular.

A atividade da enzima polifenoloxidase (Tabela 10) para o tratamento com EBA de *E. arvense* (T2), produto comercial a base de extratos vegetais (T4), produto comercial a base de fosfito de potássio (T5), produto comercial a base de óleos vegetais (T6) e adjuvante (T9) tiveram sua atividade elevada na primeira e na segunda aplicação. Para o tratamento com EBA de *M. oleifera* (T3) o aumento da atividade foi observado na primeira aplicação.

Os tratamentos que diferiram da testemunha na primeira aplicação, porém com menores atividades da enzima foram EBA de *R. officinalis*, EBA de *E. arvense*, Ecolife® e Tiofanato metílico. Na terceira aplicação os tratamentos com EBA de *R. officinalis* e EBA de *M. oleifera* tiveram aumento da atividade da enzima e diferiram da testemunha. Na segunda e quarta aplicação não houve diferença entre os tratamentos.

Vieira (2013) avaliou o efeito do nitroprussiato de sódio (SNP) sobre a longevidade pós-colheita de inflorescências de epidendro e a sua ação no sistema antioxidativo. Nas inflorescências pulverizadas com SNP houve inibição da atividade da peroxidase. A atividade das enzimas catalase, ascorbato peroxidase e polifenoloxidase não foram alteradas.

Verificaram que o óxido nítrico causou efeito deletério em flores de epidendro inibindo a atividade de enzimas do sistema antioxidativo.

Tabela 10: Atividade específica da enzima polifenoloxidase ($\text{abs min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína) em folhas de roseiras após aplicação dos tratamentos

Tratamentos	Antes da aplicação 0h	Aplicação 1 1 dia 24h	Aplicação 2 10 dias 24h	Aplicação 3 20 dias 24h	Aplicação 4 30 dias 24h
1	0,36 Aa	0,33 Ba	0,34 Aa	0,37 Aa	0,28 Aa
2	0,32 Aa	0,29 Ba	0,28 Aa	0,21 Bb	0,14 Ab
3	0,38 Ab	0,51 Aa	0,33 Ab	0,28 Ac	0,14 Ad
4	0,33 Aa	0,38 Aa	0,22 Ab	0,19 Bb	0,11 Ab
5	0,37 Ab	0,48 Aa	0,34 Ab	0,24 Bc	0,14 Ac
6	0,41 Aa	0,44 Aa	0,29 Ab	0,24 Bb	0,11 Ac
7	0,44 Aa	0,27 Bb	0,32 Ab	0,15 Bc	0,19 Ac
8	0,29 Aa	0,23 Ba	0,19 Aa	0,20 Ba	0,19 Aa
9	0,35 Aa	0,37 Aa	0,29 Aa	0,20 Bb	0,12 Ab
10	0,29 Aa	0,30 Aa	0,32 Aa	0,24 Ba	0,28 Aa
CV(%)	31,85	40,99	33,63	51,62	49,29

Tratamentos: T1: EBA (10%) *Rosmarinus officinalis*, T2: EBA de *Equisetum arvense* (10%), T3: EBA de *Moringa oleifera* (10%), T4: Produto comercial a base de extratos vegetais fermentados (0,1%), T5: Produto comercial a base de fosfito de potássio (0,1%), T6: Produto comercial a base de óleos vegetais (0,1%), T7: Ecolife® (0,1%), T8: Tiofanato metílico (0,07%), T9: Adjuvante (0,025%), T10: Água destilada.

Médias seguidas da mesma letra maiúsculas na coluna e minúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

5 CONCLUSÕES

Nas condições deste trabalho pode-se concluir que:

- No experimento *in vitro* houve maior redução do crescimento fungistático de *Diplocarpon rosae* quando na presença do produto comercial a base de óleos vegetais

- o efeito anti-esporulante foi com o EBA de *E. arvense* e o produto comercial a base de extratos vegetais fermentados.

- No micélio fúngico o aumento da síntese de proteína foi observada nos tratamentos com EBA de *R. officinalis*, EBA de *E. arvense*, EBA de *M. oleifera*, produtos comerciais a base de óleos vegetais e Ecolife®. O aumento da peroxidase do micélio foi obtido com EBA de *R. officinalis* e o aumento da catalase com o produto comercial a base de fosfito de potássio.

- Nas roseiras cultivadas em casa de vegetação o produto comercial a base de fosfito de potássio promoveu o maior comprimento de haste e também maior espessura da haste, juntamente com o produto comercial a base de extratos vegetais fermentados e óleos vegetais.

- As maiores atividades específicas de catalase foram observadas em roseiras tratadas com EBA de *M. oleifera* e produto comercial a base de fosfito de potássio. O tratamento com produto comercial a base de fosfito de potássio promoveu incremento na atividade específica de peroxidase do guaiacol e o EBA de *R. officinalis* e EBA de *M. oleifera* na polifenoloxidase.

De maneira geral os produtos naturais testados são promissores no controle do fungo *D. rosae* e na indução de resistência em plantas de roseira bem como o cultivo em casa de vegetação que contribuiu significativamente para a qualidade das rosas de corte.

REFERÊNCIAS

- AGROFIT: Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em:<http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em 12 Dez. 2015.
- ALMAGRO, L.; GÓMEZ-ROS, L.V.; BELCHI-NAVARRO,S.; BRU, R.; ROSBARCELO, A.; PEDREÑO, M.A. Class III peroxidases in plant defence reactions. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, p. 377-390, 2009.
- ALMEIDA, E.F.A.; RIBEIRO, M.N.O.; REIS, S.N.; JUNIOR, P.M.R.; CARVALHO, L.M.C. **Doenças de Roseira**. Circular técnica, n.154 - EPAMIG - Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, 2012.
- AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**, 4 ed. v.1, Piracicaba: Ceres, 2011.
- ARNON, D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *beta vulgaris*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 24, p. 1-15, 1949.
- ARVENISIS Agro. Disponível em:<<http://www.arvensis.com/es/productos-destacados/id/9>>, Acesso em 12 Dez. 2015.
- BAKER K.F. The history, distribution and nomenclature of the Rose black spot fungus. **Plant Disease Report**. v.32, p.260-274, 1948.
- BARBOSA, J. G. **Produção comercial de rosas**. Viçosa: Aprenda Fácil, 2003. 200p.
- BASTOS, C.N. Efeito do óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipelis* e outros fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, n.3, p.441-3, 1997.
- BATALHA, M.O.; BUAINAIN, A. M. **Cadeias produtivas de flores e mel**. Brasília: IICA: MAPA/SPA, 2007.
- BERTALOT M.J.A.; CARVALHO-PUPATTO J.G.; FURTADO E.L.; ROSA D.D.; MENDONZA E.; LIMA A.B.; Métodos alternativos para controle de doenças fúngicas na cultura de jambu (*Spilanthes oleraceae* L.) através de *Equisetum* spp e preparado biodinâmico 501, **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.5, n.2, p. 264-274, 2010.
- BERTALOT M.J.A.; CARVALHO-PUPATTO J. G.; MENDOZA, E.M.; MENDES R.D.; BUSO D. **Controle alternativo de doenças do morangueiro**. Agricultura Biodinâmica, 2009.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 341p.,2009.
- BEZERRA, A.M.; MOMENTE, V.G.; MEDEIROS FILHO, S. Germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de Moringa (*Moringa oleifera* Lam.) em função do peso da semente e do tipo de substrato. **Horticultura Brasileira**. v. 22, n. 2, p. 295-299,2004.

BIZI, R.M. Utilização de fungos no controle biológico de doenças. Londrina: UFPR, 2011. Disponível em: <<http://www.floresta.ufpr.br/~lpf/contbio03.htm>> Acesso em: 20 dez. 2015.

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

CAIXETA, A.O.; VIEIRA, B.S.; CANEDO, E.J. Efeito do fosfito de potássio sobre fungos fitopatogênicos do feijoeiro. **Revista do Centro Universitário de Patos de Minas**. v. 2178, p.7662, 2012.

CAMATTI-SARTORI, V.; MAGRINI, F.E.; CRIPPA, L.B.; MARCHETT, C.; VENTURIN, L.; SILVA-RIBEIRO, R.T.; Avaliação *in vitro* de extratos vegetais para o controle de fungos patogênicos de flores, **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.6, n.2, p.117- 122, 2011.

CAMPBELL, C.L.; MADDEN, L.V. **Introduction to Plant Disease Epidemiology**. New York: John. Wiley, 532 p.,1990.

CASARINI, E. **Manejo da irrigação na cultura da roseira cultivada em ambiente protegido**. Piracicaba: ESALQ, 2000. 66p. Dissertação de Mestrado.

CASARINI, E. **Doses de N e K aplicados via fertirrigação na cultura da roseira (*Rosa* sp.) em ambiente protegido**. Piracicaba: ESALQ, 2004. 102p. Tese Doutorado.

CAVALCANTI, F.R.; RESENDE, M.L.V.; ZACARONI, A.B.; RIBEIRO JUNIOR, P.M.; COSTA, J.C.B.; SOUZA, R.M. Acibenzolar-S-Metil e Ecolife na indução de respostas de defesa do tomateiro contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31 n. 4, p.372-380, 2006.

CAVASINI, R. **Inibidores de etileno na pós-colheita de *Lisianthus***. Dissertação Faculdade de Ciências Agrônomicas da Unesp – Campus de Botucatu, 2013.

CEPEA 2015. In. Mapeamento e quantificação da cadeia de flores e plantas ornamentais do Brasil. Disponível em:< <http://www.ibraflor.com/publicacoes/vw.php?cod=248>>. Acesso em 22 Dez. 2015.

CONSTABEL, C. P.; BERGEY, D. R.; RYAN, C. A. Systemin activates synthesis of wound-inducible tomato leaf polyphenol oxidase via the octadecanoid defense signaling pathway. **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington, v. 92, p. 407-411, 1995.

CRUZ, M.E.S; CRUZ, M.J.S; NANAMI, D.S.Y, SCHWAN-ESTRADA, K.R.F; SIMON, J.M.; RYCHE, A.G.G. ***Moringa oleifera* na conservação de banana em pós- colheita**. In. Potencialidades da *Moringa oleifera* Lam. Vol. 3, p. 345-358, 2013.

DÍAZ DELLAVALLE, P.; CABRERA, A.; ALEM, D.; LARRAÑAGA, P.; ERREIRA, F.; RIZZA, M.D. Antifungal activity of medicinal plant extracts against hytopathogenic fungus *Alternaria* spp. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v.71, p.231-239, 2011.

DICKINSON, T.A.; EVANS, R.C.; CAMPBELL, C.S., 2002. Rosaceae classification and phylogeny: introduction and overview. ASPT Colloquim: Rosaceae Phylogeny. Disponível em: <www.2002.botanyconference.org/sympos13/abstracts. Acesso em 17 Set. 2015.

DOREY, S.; BAILLIEUL, F.; PIERREL, M.A.; SAINDRENAN, P.; FRITIG, B.; KAUFFMANN, S. Spatial and temporal induction of cell death, defense genes, and accumulation of salicylic acid in tobacco leaves reacting hypersensitively to a fungal glycoprotein elicitor. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, St. Paul, v.10, p.646-655, 1997.

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

DURNER, J.; SHAH, J.; KLESSIG, D.F. Salicylic acid and disease resistance in plants. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 2, p. 266-274, 1997.

ESHAGHDAVATGAR, L.; JAFARPOUR, M.; GOLPARVAR, A.R. Comparing Medicinal Plant Extracts and Pulsing Treatments on Rose Cut Flowers "Dolce Vita". **Scientia Agriculturae**, v.4(1),p.1-4, 2013.

FERNANDES, C.F.; VIEIRA JUNIOR, J.R.; SILVA, D.S.G. ; REIS, N.D.; ANTUNES JUNIOR, H. . Mecanismos de defesa de plantas contra o ataque de agentes fitopatogênicos. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2009

FERRAZ, M.V.; CEREDA, M.P. Influência de diferentes tratamentos pós-colheita com películas de amido nas características químicas de rosas (*Rosa hybrida* var. grand galla). **Agrarian**, v. 2, n. 4, p. 63-72, 2009.

FERRAZ, S.; LOPES, E.A.; AMORA, D.X. **Controle de fitonematoides com o uso de extratos e óleos essenciais de plantas**. In: POLTRONIERI, L. S.; ISHIDA, A. K. N. (Ed). Métodos alternativos de controle de insetos-praga, doenças e plantas daninhas. Panorama atual e perspectivas na agricultura. Belém: EMBRAPA Amazônia Oriental, 308 p., 2008.

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

FERREIRA, P.M.P.; FARIAS, D.F.; OLIVEIRA, J.T.A.; CARVALHO, A.F.U. *Moringa oleifera*: bioactive compounds and nutritional potential. **Revista de Nutrição**. v. 21, n. 4, p. 431-437, 2008.

FIALHO, M.B.; CARVALHO, G.; MARTINS, P.F.; AZEVEDO, R.A.; PASCHOLATI, S.E.F. Antioxidative response of the fungal plant pathogen *Guignardia citricarpa* to antimicrobial volatile organic compounds. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 20, p. 2077-2084, 2014.

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

GACHKAR, L.; YADEGARI, D.; REZAEI, M.B.; TAGHIZADEH, M.; ASTANEH, S.A.; RASOOLI, I. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. **Food Chemistry**, v.102, p.898-904, 2007.

GAYATRIDEVI, S.; JAYALAKSHMI, S.K.; SREERAMULU, K. Salicylic acid is a modulator of catalase isozymes in chickpea plants infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. Ciceri. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.52, p.154-161, 2012.

GEERDINK, G.M. **Efeito de tratamentos pré e pós-colheita na qualidade de rosas de corte**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo (USP). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2012.

GIFONI, J.M.; OLIVEIRA, J.T.A.; OLIVEIRA, H.D.; BATISTA, A.B.; PEREIRA, M.L.; GOMES, A.S.; OLIVEIRA, H.P.; GRANGEIRO, T.B.; VASCONCELOS, I.M. A novel chitin-binding proteina from *Moringa oleifera* seed with potential for plant disease control. **Biopolymers**, v.98,p.406-415, 2012.

GILL, S.S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.48, p.909-930, 2010.

GOMES, A.S. **Purificação, caracterização físico-química e biológica de proteínas ligantes à quitina presentes nas sementes de *Moringa oleifera* Lamarck**. Monografia, Departamento de Biologia, IFC, Fortaleza, 100 p.,2002.

GULSEN, O.; EICKHOFF, T.; HENG-MOSS, T.; SHEARMAN, R.; BAXENDALE, F.; SARATH, G.; LEE, D. Characterization of peroxidase changes in resistant and susceptible warm-season turf grasses challenged by *Blissus occiduus*. **Arthropod Plant Interact**, v.4, p. 45-55, 2010.

GURGEL, L.M.S., COELHO, R.S.B., DA SILVA, R.L.X.; DE OLIVEIRA, S.M.A.; DA ROSA, R.C.T.; DE ASSIS, T.C.; ANDRADE, D.E.G.T. Metodologia alternativa no manejo da antracnose pós-colheita em *Heliconia rostrata*. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, v.19, n.1, p.20-24, 2014.

HAMMOND-KOSACK, K.E.; JONES, J.D.G. Responses to plant pathogens. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Ed.) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Rockville, Maryland, **American Society of Plant Physiologists**, cap.21, p.1102-1157, 2000.

HIRAGA, S.; SASAKI, K.; HIROYUKI, I.; OHASHI, Y.; MATSUI, H. A large family of class III plant peroxidase. **Plant Cell Physiology**, v.42, p.462-468, 2001.

HU, Z.; SHEN, Y.; SHEN, F.; SU, X. Effects of feeding *Clostera anachoreta* on hydrogen peroxide accumulation and activities of peroxidase, catalase, and ascorbate peroxidase in *Populus simonii* x *P. pyramidalis* 'Opera 8277' leaves. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.31, p.995-1002, 2009.

INFOAGRO. **El cultivo de rosas para corte**. Disponível em: <<http://www.infoagro.com/flores/flores/rosas.htm>>. Acesso em: 5 Mar. 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FLORICULTURA-IBRAFLOR. Números do setor, mercado interno. Holambra, SP, 2014. Disponível em: <http://www.ibraflor.com/ns_mer_interno.php>. Acesso em: 25 Out. 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FLORICULTURA-IBRAFLOR. Boletim informativo. Holambra, SP, 2015. Disponível em: <<http://www.ibraflor.com/boletim.php>>. Acesso em: 05 Dez. 2015.

ISENBERG, M.; NOZAKI, M.H. Controle alternativo de *Diplocarpon rosae*. **Revista Varia Scientia Agrárias**, v.3, n.02, p.135-145, 2013.

ITAKO, A.T.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; TOLENTINO JÚNIOR, J.B.; CRUZ, M.E.S. Controle de *Cladosporium fulvum* em tomateiro por extratos de plantas medicinais. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.76, n.1, p.75-83, 2009.

ITAKO, A.T.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; TOLENTINO JÚNIOR, J.B.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M.E.S. Atividade antifúngica e proteção do tomateiro por extratos de plantas medicinais. **Tropical Plant Pathology**, v.33, n.3, p.241-244, 2008.

JOLY, A.B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 3. Ed. São Paulo: Ed. Nacional, 777 p., 2002.

JUNQUEIRA, A.H.; PEETZ, M.S. Mercado interno para os produtos da floricultura brasileira: características, tendências e importância socioeconômica recente. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.14, n.1, p.37-52, 2008.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de Fitopatologia, Doenças das plantas cultivadas**, 4 ed., v.2, cap.60, 535p., São Paulo: Agronômicas Ceres, 2005.

KNAAK, N.; FIUZA, L.M. Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insetos e microrganismos. **Neotropical Biology & Conservation**, v.5, n.2, 2010.

KÖPPEN, W. Climatologia: com um estúdio de los climas de la tierra. México: Fondo de Cultura Economica, 478p., 1948.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas**. 3. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 608p., 2000.

LORENZI, H.; MATOS, F.J. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas Cultivadas**. 1 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 512p., 2006.

LOVATT, C.J.; MIKKELSEN, R.L. Phosphite fertilizers: what are they? Can you use them? What can they do? **Better Crops**, Norcross, v.90, n.4, p.11-13, 2006.

ŁUKASIK, I.; GOŁAWSKA, S.; WÓJCICKA, A. Effect of cereal aphid infestation on ascorbate content and ascorbate peroxidase activity in triticale. **Polish Journal of Environmental Studies**, v.21, p.1937-1941, 2012.

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

MAIA, A.J.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; FARIA, C.M.D.R.; OLIVEIRA, J.S.B.; JARDINETTI, V.A.; BATISTA, B.N. Óleo essencial de alecrim no controle de doenças e na indução de resistência em videira. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.49, n.5, p.330-339, 2014.

MOHAMMADI, M.; KAZEMI, H. Changes in peroxidase and polyphenol oxidases activities in susceptible and resistance wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. **Plant Science**, Amsterdam, v.162, p.491-498, 2002.

OKOT-KOTBER, M.; LIAVOGA, A.; YONG, K.J.; BAGOROGOZA, K. Activation of polyphenol oxidase in extracts of bran from several wheat (*Triticum aestivum*) cultivars using organic solvents, detergents, and chaotropes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.50, p.2410-2417, 2002.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A., KIMATI, H. & AMORIM, L. (Editores). **Manual de fitopatologia** - princípios e conceitos. Vol. I. São Paulo, Ed. Agronômica Ceres, p. 417-454, 1995.

PASCHOLATI, S. Fisiologia do parasitismo: Como as plantas se defendem dos patógenos. In: BERGAMIN FILHO, A., KIMATI, H.; AMORIM, L. (Editores). **Manual de fitopatologia** - princípios e conceitos. Vol. I. São Paulo, Ed. Agronômica Ceres, p. 594, 2011.

PRASAD, K.T.; ANDERSON, M.D.; MARTIN, B.A.; STEWART, C.R. Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. **The Plant Cell**, v.6, p.65, 1994.

PROMYOU, S., KETSA, S., VAN DOORN, W.G. Salicylic acid alleviates chilling injury in anthurium (*Anthurium andraeanum* L.) flowers. **Postharvest Biology and Technology**, v.64, p.104-110, 2012.

RANGEL, M.S.A. **Moringa oleifera; uma planta de uso múltiplo**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, (Embrapa-CPATC. Circular Técnica, 9), 41p., 1999.

REICH, F.S.; CARVALHO, R.I.N. Comercialização de rosas, violetas e crisântemos em Curitiba-PR. **Revista Acadêmica: ciências agrárias e ambientais**, v.2, n.3, p.19-26, 2004. Disponível em: <<http://www2.pucpr.br/reol/index.php/ACADEMICA?dd1=80>>. Acesso em: 20 Out. 2015.

REIGOSA, M.; PEDROL, N. Allelopathy from molecules to ecosystems. Plymouth, **Science Publishers**, 316 p.2002.

REIS, S.N.; RESENDE, M.L.V.; SOUZA, R.G.; ALMEIDA, E.F.A. Doenças em plantas ornamentais. **Informe Agropecuário**. Floricultura: tecnologias, qualidade e diversificação, Belo Horizonte, v.30, n.249, p.47-55, 2009.

RODRIGUES, E.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M.E.S.; FIORI-TUTIDA, A.C.G. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de gengibre e eucalipto *in vitro* e em fibras de bananeira infectadas com *Helminthosporium* sp. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.28, n.1, p.123-127, 2006.

RODRIGUES, M.S.; JARDINETTI, V.A.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S. Uso de *Moringa oleifera* Lam. No controle de *Corynespora casiiicola* em tomateiro. In. Potencialidades da *Moringa oleifera* Lam. v.3, p.385-394, 2013.

ROMA, R.C.C. Fosfito de potássio no controle de doenças pós-colheita em bagas de uva Itália e possíveis mecanismos de ação à *Rhizopus stolonifer*. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2013.

SANTOS, M.C.; BRUSCATTO, M.H.; HECK, R.M., Reflexões fitoterápicas sobre a cavalinha (*Equisetum* sp.) com base na antroposofia, XVII Congresso de Iniciação de Científica, UFPEL, 2009.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN J.R. **Extratos e óleos essenciais de plantas medicinais na indução de resistência.** In: CAVALCANTI L.S.; DI PIERO R.M.; CIA P; PASCHOLATI S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO R.S. (Eds.) Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. Piracicaba SP. FEALQ. p.125-132, 2005.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F. **Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal.** In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). Interação Planta Patógeno – fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular. Piracicaba: FEALQ. p.227-248, 2008.

SEBRAE. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. Flores e plantas ornamentais do Brasil. V.1. Série Estudos mercadológicos. Disponível em: <http://www.hortica.com.br/artigos/2015/FPO_BR_Estudos_Mercadologicos_2015_Vol1.pdf>. Acesso em: 20 Out. 2015.

SEBRAE. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. Série perfil de projetos. Unidade produtora de flores de corte. Vitória, ES. 1999. Disponível em: <[http://www.dce.sebrae.com.br/bte/bte.nsf/06F366A59E99DD9503256E5A006690DE/\\$File/N T0003D182.PDF](http://www.dce.sebrae.com.br/bte/bte.nsf/06F366A59E99DD9503256E5A006690DE/$File/N T0003D182.PDF)>. Acesso em: 17 Nov. 2015.

SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO DO ESTADO DO PARANÁ - SEAB. Departamento de Economia Rural - DERAL. Valor da Produção da Agropecuária Paranaense, 2013. Curitiba, PR, 2014.

SILVA, C.J. **Uso de óleos essenciais, extratos vegetais e indutores de resistência no controle alternativo do mal-dopanamá da bananeira.** Universidade Federal de Alagoas, Alagoas.p.97, 2007.

SILVA, M.B.; ROSA, M.B.; BRASILEIRO, B.G.; ALMEIDA, V.; SILVA, C.A. Desenvolvimento de produtos à base de extratos de plantas para o controle de doenças de plantas. In: VENEZON, M.; PAULA JÚNIOR, T. J.; PALLINI, A. **Controle alternativo de pragas e doenças.** Viçosa: Epamig/CTZM. p.221-46, 2005.

SILVA, R.A.C.; SOUSA, T.O.; DIAS, L.P.; ANDRADE, T.J.A.S. Ação do extrato metanólico da *Moringa oleifera* sobre o crescimento micelial de fitopatógenos. IV Congresso de pesquisa e inovação da rede norte e nordeste de educação tecnológica. **Anais...** Belém, PA, 2009.

SOARES, R.M.; GODOY, C.V.; OLIVEIRA, M.C.N. Escala diagramática para avaliação da severidade da mancha alvo da soja. **Tropical Plant Pathology**, Brazil, v.34,5, p.333-338, 2009.

SONEGO, O.R; GARRIDO, L.R.; CZERMAINSKI, A.B.C. Avaliação do Fitophos K e Fitophos K plus (fosfito de potássio) no controle do míldio da videira. In: ENFRUTE, 8., Fraiburgo, SC. **Anais....** Florianópolis: EPAGRI, 2005. v.2, 271p, p.12, 2005.

SOYLU, E.M.; SOYLU, S.; KURT, S. Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. **Mycopathologia**, v.161, p.119-128, 2006.

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

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J.P. Systemic acquired resistance. **Annual Review Phytopathology**, Paulo Alto, v.35, p.235-270, 1997.

TERRY, L.A.; JOYCE, D.C. Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.32, p.1-13, 2004.

THIPYAPONG, P.; HUNT, M.D.; STEFFENS, J.C. Antisense downregulation of polyphenol oxidase results in enhanced disease susceptibility. **Planta**, Berlin, v.220, p.105-117, 2004.

TOMANKOVÁ K.; LUHOVÁ, L.; PETRIVALSKÝ, M.; PEC, P.; LEBEDA, A. Biochemical aspects of reactive oxygen species formation in the interaction between *Lycopersicon* spp. and *Oidium neolycopersici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.68, p.22-32, 2006.

VAZ, A.P.A.; JORGE, M.H.A. Série Plantas Mediciniais Condimentares e Aromáticas. Alecrim. Corumbá-MS: Embrapa Pantanal, 2006. Disponível em: <<http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/FOL68.pdf>>. Acesso em 18 Out. 2015.

VAZ, A.P.A.; JORGE, M.H.A. Série Plantas Mediciniais Condimentares e Aromáticas. Cavalinha. Corumbá-MS: Embrapa Pantanal, 2006. Disponível em: <<http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/FOL80.pdf>>. Acesso em: 18 Out. 2015.

VEILING HOLAMBRA, Flores e Plantas ornamentais. Critério de Classificação Rosa de Corte. Disponível em:<http://veiling.com.br/uploads/padrao_qualidade/criterios/rosa-fc.pdf>. Acesso em 12 Out. 2015.

VIEIRA, L.M. **Influência do óxido nítrico na longevidade pós-colheita de inflorescências de *Epidendrum ibaguense* Kunth.** Tese de doutorado. Universidade Federal de Viçosa (UFV). Minas Gerais, 2013.

WANG, W.; WU, N.; ZU, Y. G.; FU, Y. J. Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. **Food Chemistry**, v.10, 2008.

WAR, A.R.; PAULRAJ, M.G.; AHMAD, T.; BUHROO, A.A.; HUSSAIN, B.; IGNACIMUTHU, S.; SHARMA H.C. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. **Plant Signaling & Behavior**, v.7, p.1306-1320, 2012.

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

WOJDYŁA, A.T. Grapefruit extract activity in the control of rose powdery mildew and black spot. **Mededelingen (Rijksuniversiteit te Gent. Fakulteit van de Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen)** v.66.2a, p.167-177, 2000.

WOJDYLA, A.T. Effect of vegetable and mineral oils on the development of *Sphaerotheca pannosa* var. *Rosae*—the causal agent of powdery mildew of rose. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, v.21, n.4, p.855-862, 2015.

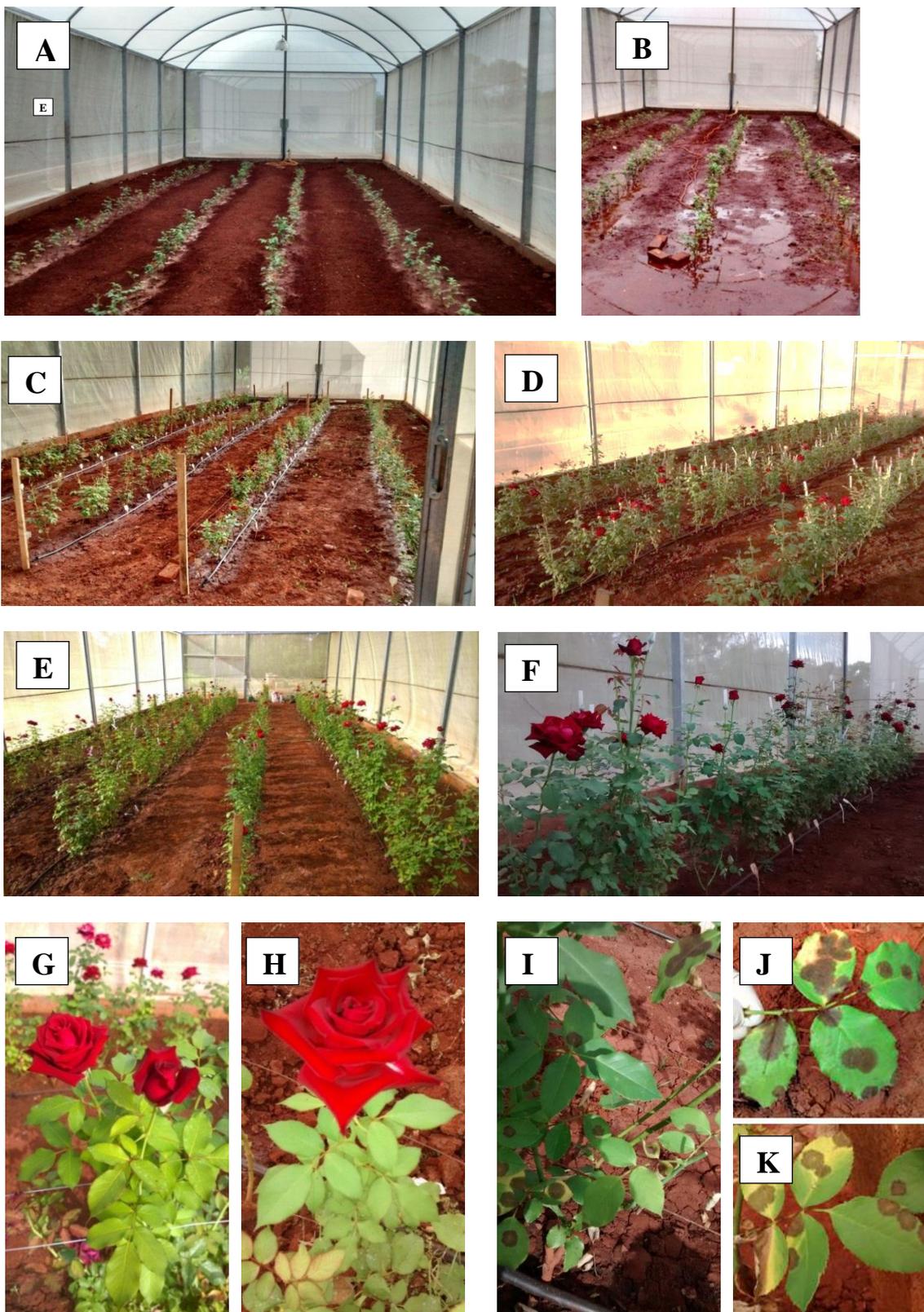
Wolf FA 1912. The perfect stage of *Actinonema Rosae*. Bot. Gaz. 54: 218-234.

APÊNDICE A - Características químicas do solo da área experimental

pH		AB ⁺	H+Al ³⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	CTC	V	Ca	Mg	K	MO
CaCl ₂	H ₂ O			... cmol _c dm ⁻³%...		
7,4	8,2	0	1,57	12,19	2,93	0,22	16,91	90,72	72,08	17,34	1,3	6,39
Ca/Mg		Ca/K	Mg/K	Ca+Mg+K		Fe	Zn	Cu	Mn	P	C	
								... mg dm ⁻³ ...			g dm ⁻³	
4,16		55,4	13,33	68,73						10,94	3,71	

Ca, Mg e Al - extraídos com KCl 1N P, K, Fe, Zn, Cu e Mn - extraídos com Mehlich

APÊNDICE B – Prancha de fotos



Experimento casa de vegetação: A) implantação. B) inundação. C, D) primeira colheita. E,F) segunda colheita. G,H) Hastes florais da primeira e segunda colheita. I,J,K) Sintomas de pinta preta nas folhas.

ANEXO

Escala diagramática adaptada da mancha alvo da soja (Soares et al., 2009).

