

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOLOGIA
MESTRADO PROFISSIONAL EM AGROECOLOGIA

VILMA PEREIRA DE MELO

Controle alternativo de mofo cinzento (*Botrytis cinerea*) em gérberas (*Gerbera jamesonii*) e desenvolvimento da escala diagramática

Maringá
2019

VILMA PEREIRA DE MELO

Controle alternativo de mofo cinzento (*Botrytis cinerea*) em gérberas (*Gerbera jamesonii*) e desenvolvimento da escala diagramática

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

Área de concentração: Agroecologia.
Orientadora: Prof. Dra. Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada

Maringá
2019

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

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

M528c Melo, Vilma Pereira de
 Controle alternativo de mofo cinzento (*Botrytis cinerea*) em gérberas (*Gerbera jamesonii*) e desenvolvimento da escala diagramática / Vilma Pereira de Melo. -- Maringá, 2019.
 xii, 48 f. : il. color.

 Orientadora: Prof^a. Dr^a. Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada.
 Coorientadora: Prof.^a Dr.^a nome da orientadora.
 Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Agroecologia, 2019.

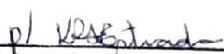
 1. Fungos fitopatogênicos. 2. *Gerbera jamesonii*. 3. Controle de doenças. 4. Escala diagramática. I. Schwan-Estrada, Kátia Regina Freitas, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Agronomia. Programa de Pós-Graduação em Agroecologia. III. Título.

CDD 23.ed. 632.4

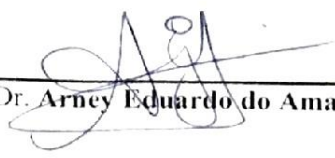
Síntique Raquel de C. Eleuterio - CRB 9/1641

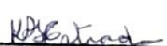
FOLHA DE APROVAÇÃO

ATA DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DA PÓS-GRADUANDA VILMA PEREIRA DE MELLO. Aos vinte e cinco dias do mês de fevereiro de dois mil e dezenove, às quatorze horas, no Bloco J35, Sala 101- Laboratório de Fisiopatologia, Campus Sede da Universidade Estadual de Maringá (UEM), reuniu-se a Banca Examinadora da Dissertação em epígrafe, composta pelos Professores Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada e Edilaine Maurícia Gelinski Grabicoski da Universidade Estadual de Maringá – UEM, Arney Eduardo do Amaral Ecker do Centro Universitário Ingá – UNINGÁ e, por participação remota, via Skype, pela Professora Doutora Solange Maria Bonaldo da Universidade Federal do Mato Grosso – UFMT-Sinop. A sessão foi aberta pelo Professor Doutor Arney Eduardo do Amaral Ecker, que apresentou os membros da Banca Examinadora, passando em seguida a palavra à candidata VILMA PEREIRA DE MELLO, para que fizesse uma exposição de seu trabalho, intitulado: **Controle alternativo de mofo cinzento (*Botrytis cinerea*) em gérberras (*Gerbera jamesonii*) e desenvolvimento da escala diagramática.** A candidata foi argüida pela Banca Examinadora e, após o término dos trabalhos, a Banca Examinadora procedeu ao julgamento, sendo, ao final, a pós-graduanda VILMA PEREIRA DE MELLO considerada aprovada. Este resultado deverá ser homologado pelo Conselho de curso do Programa de Pós-Graduação em Agroecologia (PROFAGROEC) da UEM. Conforme previsto no Regulamento, a pós-graduanda somente fará jus ao respectivo Diploma, que conferirá o Título de Mestre, quando atender às demais exigências do PROFAGROEC relativas à publicação da Dissertação e dos resultados obtidos na mesma, atendendo à normativa expedida pelo Conselho de curso do PROFAGROEC. Nada mais havendo a tratar, a senhora presidente declarou encerrados os trabalhos. Para constar, foi lavrada a presente Ata, que segue assinada pelos membros da Banca Examinadora, após lida e achada conforme. Maringá, aos vinte e cinco dias do mês de fevereiro de dois mil e dezenove.


Prof.^a. Dr.^a. Solange Maria Bonaldo


Prof.^a. Dr.^a. Edilaine Maurícia Gelinski
Grabicoski


Prof. Dr. Arney Eduardo do Amaral Ecker


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

(Orientadora)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha mãe Eunice de Oliveira Servilheri, a meus filhos Alan Pereira de Melo e João Pedro Pereira Lemes da Silva e a todos que andam ao meu lado nessa caminhada pela estrada da Vida.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Deus primeiramente, por tudo o que tenho, por tudo o que sou e, também, por todas as oportunidades que ele me proporcionou nessa vida.

A toda minha família, em especial minha mãe Eunice de Oliveira Servilheri, que sempre me incentivou a estudar cada dia mais e mais, me ensinando que o mais importante é manter o foco e correr atrás dos meus sonhos, a fim de mudar a nossa realidade e os meus filhos Alan Pereira de Melo e João Pedro Pereira Lemes da Silva, razão de tudo o que sou e do que faço.

Agradeço à minha orientadora, Profa Dra. Kátia Regina Freitas Schwan Estrada, por toda confiança que me foi dada desde o início do mestrado e, principalmente, por toda orientação, dicas, conselhos e ensinamentos. O meu muito obrigado e que Deus lhe abençoe grandemente!

Aos meus queridos amigos Lorrant Cavanha Gabriel e Bruna Rissato, que me ajudaram muito ao longo desses dois anos, além de terem me proporcionado ótimos momentos.

Ao Professor Arney, pela disciplina ofertada a qual foi proporcionado conhecimentos que ajudaram no desenvolvimento dessa pesquisa.

À secretária do Programa de Pós-graduação em Agroecologia, Leila, que, com muito profissionalismo, sempre me ajudou.

Controle alternativo de mofo cinzento (*Botrytis cinerea*) em gérberas (*Gerbera jamesonii*) e desenvolvimento da escala diagramática

RESUMO GERAL

Dentre as diversas plantas ornamentais cultivadas no Brasil e no mundo, as gérberas (*Gerbera jamesonii* Adian) se destacam devido ao seu progressivo aumento no mercado consumidor de muitos países, tornando-se uma cultura promissora. Um dos grandes desafios da produção dessas flores está relacionado ao controle de doenças. Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi avaliar *in vitro* e *in vivo* a atividade fungitóxica de extratos vegetais de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) e bioformulado, ambos nas concentrações 5, 10 e 20%, sobre o desenvolvimento do mofo cinzento (*Botrytis cinerea*) na cultura da gérbera, bem como validar uma escala diagramática para estudos de severidade da doença na planta. Como testemunhas, utilizou-se água destilada e o fungicida Mancozeb. Os experimentos foram realizados em duplicata. *In vitro*, os tratamentos com capim-limão 20% e as três concentrações de bioformulado foram os mais eficientes em inibir o crescimento micelial e a esporulação do fungo. Em casa de vegetação, estes mesmos tratamentos foram os que melhor controlaram a doença. Para a elaboração da escala diagramática, foram coletadas 200 folhas de gérbera com diferentes graus de severidade da doença e levadas ao laboratório para seleção e captação das imagens com o aplicativo Quant v.1.0.2. As imagens foram analisadas por 22 avaliadores experientes e por 13 avaliadores inexperientes. Conhecendo o grau de severidade real pode-se, através da análise de regressão, determinar a relação entre o grau de severidade real e o grau de severidade estimado com e sem o uso da escala. A precisão do avaliador foi determinada pelo coeficiente de determinação (R^2) e pela variância. A escala proposta apresentou-se como uma ferramenta assertiva para a quantificação da severidade do mofo cinzento. A acurácia e precisão de todos os avaliadores aumentaram quando usaram a escala. Portanto, os ganhos foram maiores para os avaliadores sem experiência, chegando a 69,2%.

Palavras-chave: Bioformulado, Capim-limão, Fitopatometria. Floricultura. Manejo orgânico

Alternative control of gray mold (*Botrytis cinerea*) in gerbera (*Gerbera jamesonii*) and development of diagrammatic scale

GENERAL ABSTRACT

Gerbera (*Gerbera jamesonii* Adian) stands out due to its progressive increase in the consumer market of many countries, making it a promising crop. One of the great challenges of producing these flowers is related to disease control. The objective of this work was to evaluate *in vitro* and *in vivo* the fungitoxic activity of lemon grass (*Cymbopogon citratus*) and bioformulated extracts, both at concentrations of 5, 10 and 20%, on the development of gray mold (*Botrytis cinerea*) in gerbera, as well as to validate a diagrammatic scale for studies of disease severity in the plant. As controls, distilled water and the fungicide Mancozeb were used. The experiments were performed in duplicate. *In vitro* treatments with 20% lemongrass and the three concentrations of bioformulated were the most effective in inhibiting mycelial growth and fungal sporulation. In greenhouse, these same treatments were those that better controlled the disease. For the elaboration of the diagrammatic scale, 200 sheets of gerbera with different degrees of disease severity were collected and taken to the laboratory for selection and capture of the images with the Quant v.1.0.2 application. The images were analyzed by 22 experienced evaluators and 13 inexperienced evaluators. Knowing the degree of real severity can be determined, through the regression analysis, to determine the relationship between the degree of actual severity and the degree of severity estimated with and without the use of the scale. The accuracy of the evaluator was determined by the coefficient of determination (R^2) and by the variance. The proposed scale was presented as an assertive tool for the quantification of gray mold severity. Accuracy and accuracy of all assessors increased when using the scale. Therefore, the gains were greater for the inexperienced appraisers, reaching 69.2%.

Keywords: Bioformulate, Lemongrass, Phytopathometry. Floriculture. Organic management

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

- Tabela 1. Crescimento micelial (cm), porcentagem de inibição do crescimento (PIC) e Área abaixo da curva do crescimento micelial (AACCM) de *Botrytis cinerea** na presença de diferentes concentrações de extrato bruto aquoso (EBA) de capim-limão e do bioformulado 25
- Tabela 2. Esporulação (conídios. 10^4 .mL⁻¹) *in vitro* de *Botrytis cinerea* na presença de diferentes concentrações de extrato bruto aquoso (EBA) de capim-limão e do bioformulado 26
- Tabela 3. Diâmetro médio das lesões (cm) de *Botrytis cinerea* e área abaixo da curva do progresso da doença mofo cinzento (AACPD), em plantas de gérbera tratadas com diferentes concentrações de extrato bruto aquoso (EBA) de capim-limão e bioformulado. Média de dois experimentos 28
- Tabela 4. Massa fresca (g) e seca (g) de plantas de gérbera, em casa de vegetação 29

CAPÍTULO 2

- Table 1. Mean concordance statistics (Lin's concordance correlation, LCC - bias, precision and agreement) with bootstrap analysis of the differences between means when estimating severity of symptoms of *Botrytis cinerea* on images of 30 diseased leaves of *Gerbera jamesonii* without or with a standard area diagram (SAD) set 43
- Table 2. The inter-rater reliability of the estimates of of severity of symptoms of *Botrytis cinerea* on leaves of *Gerbera jamesonii* made by 18 raters of 30 images of diseased leaves either without or with use of a standard area diagram sets (SADs) as an aid for assessment. Inter-rater reliability was measured using either the coefficient of determination (R^2)^a or the the intra-correlation coefficient (ρ)^b 44

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1. Diversidade de cores de *Gerbera jamesonii* 6
- Figura 2. Sintomas de mofo cinzento causado por *Botrytis cinerea* em folhas de gérbera 8

CAPÍTULO 1

- Figura 1. A - Inoculação de *Botrytis cinerea* nas folhas de gérbera. B - Fixação dos discos de micélio com fita adesiva. C - Câmara úmida. D - Gérberas com primeiros sintomas. Fonte: próprio autor 20
- Figura 2. Vasos com gérberas em bancadas em ambiente protegido localizado na Universidade Estadual de Maringá (UEM-DAG). Fonte: próprio autor 22

CAPÍTULO 2

- Figure 1. Standard area diagrams developed as an aid for assessment of disease caused by *Botrytis cinerea* on leaves of *Gerbera jamesonii* 45
- Figure 2. Estimates of severity of symptoms of *Botrytis cinerea* on images of 30 leaves of *Gerbera jamesonii* assessed by eighteen raters without use of standard area diagram (SADs) as assessment aides or using a SADs. The difference in scale bias, location bias, accuracy or overall bias, correlation coeficiente and Lin's concordance correlation coeficiente when using SADs or when not using SADs era indicated. Positive values indicate a gain, and negative values a loss in any particular statistic for that rater 46
- Figure 3. The absolute error (estimate minus true disease) of estimates of severity of symptoms of *Botrytis cinerea* on 30 images of leaves of *Gerbera jamesoni* by eighteen raters without use of standard area diagram sets (SADs) as assessment aides (**A**), or using a SADs (**B**), and the frequency of absolute error from zero without and with SADs (**C**) 47

Figure 4. The frequency of the inter-rater reliability of eighteen raters measured by the coefficient of determination (R^2) without and with use of a standard area diagram set (SAD) as an aid for assessment of thirty images of symptoms of *Botrytis cinerea* on leaves of *Gerbera jamesonii* by 18 raters 48

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 A floricultura internacional e nacional	2
2.2 Consumo e produção de flores orgânicas no mundo.....	3
2.3 Mercado e consumo de flores envasadas no Brasil	3
2.4 Produção de flores ornamentais e mercado no Paraná.....	4
2.5 Gérbera	4
2.6 Doenças associadas ao cultivo	7
2.6.1 <i>Botrytis cinerea</i>	7
3 REFERÊNCIAS.....	10
CAPÍTULO 1	14
RESUMO	15
1 INTRODUÇÃO	17
2 MATERIAL E MÉTODOS	19
2.1 Preparo dos tratamentos	19
2.2 Obtenção do isolado de <i>Botrytis cinerea</i>	19
2.3 Avaliação do crescimento micelial e esporulação de <i>Botrytis cinerea</i>	20
2.4 Casa de vegetação	21
2.5 Análise dos dados	23
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
3.1 Avaliação do crescimento micelial e esporulação de <i>Botrytis cinerea</i>	24
3.2 casa de vegetação	27
4 CONCLUSÕES	30
5 REFERÊNCIAS.....	31
CAPÍTULO 2	34
ABSTRACT	35
3.1 INTRODUCTION.....	36
3.2 MATERIAL AND METHODS	37
3.2.1 Collection of leaves, image analysis and development of SADs	37

3.2.2 Validation of SAD	38
3.2.3 Data analysis.....	38
3.3 RESULTS AND DISCUSSION	39
3.3.1 Bias, precision and agreement	39
3.3.2 Inter-rater reliability.....	40
3.4 REFERENCES.....	40

1 INTRODUÇÃO GERAL

A floricultura é uma atividade de alta rentabilidade por área, contribuindo para a diminuição do êxodo rural e aproveitamento dos minifúndios, com elevado emprego de mão-de obra familiar (SMORIGO, 2001).

O Brasil possui um grande potencial para a produção de flores e folhagens, em decorrência da grande variabilidade do clima, do imenso espaço territorial, da disponibilidade de água e umidade relativa do ar apropriada. Além disso, a floricultura ajudaria o pequeno produtor rural na diversificação da sua propriedade rural.

Dentre as flores mais cultivadas no Brasil, a gérbera (*Gerbera jamesonii*) se destaca como uma das mais produzidas. No Brasil, as gérberas se encontram dentre as cinco mais comercializadas flores de corte (INFOAGRO, 2008). A importância da gérbera como flor de corte é representativa por ser ideal para buquês, devido à grande variedade de cores. Também é importante citar a importância do cultivo industrial da gérbera para maços, principalmente nos últimos anos.

Entretanto, o cultivo de flores também apresenta problemas. Dentre eles, encontram-se as doenças, que causam inúmeros prejuízos anualmente para as culturas. Segundo Alfenas et al. (2009), o patógeno *B. cinerea* (responsável por causar o mofo cinzento nas gérberas) causa morte de mudas em reboleiras ou distribuídas aleatoriamente nos canteiros. Essa doença pode causar um alto percentual de perdas, sendo necessário algum tipo de controle, normalmente feito por meio de produtos químicos e por manejo integrado.

Considerando a constante demanda por parte dos viveiristas e produtores por recomendações de controle, aliada à ausência de produtos químicos registrados, torna-se interessante um direcionamento das pesquisas para o controle alternativo dessas doenças (BIZI, 2006).

Assim, o presente trabalho tem como objetivo avaliar diferentes produtos de origem natural e um fungicida químico, no controle *in vivo* e *in vitro* do patógeno *B. cinerea*, o causador do mofo cinzento das gérberas, além de elaborar uma escala diagramática para a doença.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A floricultura internacional e nacional

O desenvolvimento da floricultura é cada vez mais crescente sendo essa atividade uma das opções para diversificação das culturas tradicionais por apresentar retornos elevados, possuir unidade de área e rápido desenvolvimento (KEDITSU, 2013). No mundo todo, 171 países exercem floricultura (DEL & SINGH, 2016). Holanda se destaca como principal país produtor e comercializador, seguido pela China, Índia, Estados Unidos e Japão. Há outros polos de produção que impulsionam o mercado internacional, como Colômbia, Quênia, Equador e Etiópia (IBRAFLOR, 2015). No ano de 2013 a floricultura apresentou crescimento significativo nas exportações globais atingindo U\$\$ 21,6 bilhões, e apresentando aumento de 22% nos últimos cinco anos (BENERAGAMA & PEIRIS, 2016).

No Brasil, a produção vem atingindo posições consideráveis e de destaque no setor econômico, agregando alto potencial de expansão futura e representando uma das principais atividades, gerando empregos e renda para micro e pequenos produtores em todo país, com importantes parcelas do trabalho feminino rural (JUNQUEIRA et al., 2014). A demanda por flores de corte tem crescido em diversos países. O Brasil possui elevado potencial para a produção de flores e folhagens, por apresentar uma grande variabilidade do clima, vasta disponibilidade de água, umidade relativa do ar apropriada e imenso espaço territorial. A exploração econômica de flores é recente no Brasil; porém, o setor movimenta cerca de 700 a 800 milhões de dólares por ano (IBRAFLOR, 2015).

Atualmente, o território brasileiro conta com 8 mil produtores de flores atingindo em parceria cultivo de 350 espécimes com cerca de três mil variedades. Assim, a floricultura é responsável por 215.818 empregos diretos no Brasil dos quais 78.485 (36,37%) estão relacionados à produção, 8.410 (3,9%) à distribuição, 120.574 (55,87%) ao varejo e 8,349 (3,8%) em outras funções (IBRAFLOR, 2015), beneficiando a economia brasileira.

2.2 Consumo e produção de flores orgânicas no mundo

Os processos de consumo têm se sobressaído na sociedade moderna, e ao mesmo tempo, assistimos a um agravamento dos problemas ambientais resultantes do consumo. É possível mudar a demanda para produtos e serviços que são consistentes com a sustentabilidade, escolhendo uma variante do produto e/ou produtor dentre fornecedores que assegurem melhor qualidade ambiental e social. A produção orgânica e a compra responsável facilitam o desenvolvimento de uma linha de produtos correspondente por fornecedores, que por sua vez amplia a escolha para outros consumidores (HANSEN et al., 1997).

Na Itália foram realizados estudos que indicam tendência ao consumo consciente de flores. A compra de flores orgânicas nesse país é extensão natural no apoio à agricultura orgânica. Os consumidores de países do norte da Europa demonstram maior interesse em comprar flores de produções orgânicas, isso se deve ao alto nível de conscientização quanto aos efeitos positivos que essa produção alcança em relação ao ambiente e na saúde humana (BILLMANN, 2008).

No mundo, a produção de plantas ornamentais em sistema orgânico é pequena e sua expansão tem despertado interesse em vários países. A produção orgânica de flores e plantas ornamentais pode, portanto, ser uma oportunidade satisfatória para empresas que visam a diversificação e ampliação de produtos fornecidos (SCHIMMENTI, 2013).

2.3 Mercado e consumo de flores envasadas no Brasil

As plantas envasadas mostram maior potencial de consumo, diante da vida urbana contemporânea. Esse segmento obteve crescimento no agronegócio de plantas e flores ornamentais elevando de 20% em 2008 para 24,12% em 2013. O resultado apontou para uma gradual mudança nas preferências de consumo, alinhando-se com tendências mundiais, onde essas mercadorias ganham importância relativa sobre flores e folhagens de corte. Estas constatações justificam-se de uma melhor relação custo benefício para plantas e flores envasadas, dados seus menores custos, maior durabilidade e maior praticidade no uso decorativo, no manuseio doméstico ou no ambiente profissional (JUNQUEIRA et al., 2014).

2.4 Produção de flores ornamentais e mercado no Paraná

No Paraná pequenos produtores familiares vêm integrando o cultivo de plantas ornamentais com outras culturas. A produção bruta no Paraná, medida pelo valor bruto de produção (VBP), o qual define o índice de frequência anual, calculado com base na produção agrícola municipal e preços informados para produtores, cresceu 17% em 2014 em relação a 2013, chegando a R\$ 115,2 milhões, de acordo com dados recentes divulgados pela Secretária da Agricultura e do Abastecimento (INFORME PARANÁ COOPERATIVO, 2016).

Estima-se ainda, que no Paraná, atualmente há cerca de 160 produtores de flores ornamentais. Esses produtores cultivam em uma área de, aproximadamente, 420 hectares. Ainda no Estado, há cinco núcleos regionais economicamente importantes para o segmento de flores e plantas ornamentais: Maringá, Curitiba, Cascavel, Londrina e Apucarana (SEBRAE, 2015). Comercialmente, a floricultura é reconhecida como setor de potencial considerável e gerador de valiosas divisas (SAHA et al., 2014).

Em 2014, a floricultura comercial atingiu um número expressivo, gerando um PIB de R\$ 4,5 bilhões, ou seja, 0,6% do PIB agrícola do Brasil. Só na movimentação financeira foram R\$ 10,2 bilhões e 190 mil empregos diretos (IBRAFLOR, 2015). Em contrapartida com a crise que afeta a economia brasileira, o mercado de flores e plantas ornamentais teve um crescimento de 8% em 2016. Driblando a crise que afeta o país, o brasileiro está comprando mais flores, sendo que o gasto médio por cada habitante é de R\$ 26,68, os brasileiros consomem média de R\$ 43,79 em flores por ano. O faturamento chegou a R\$ 5,7 bilhões em 2014, R\$ 6,2 bilhões em 2015, e em 2016 com crescimento de 8%, o mercado faturou R\$6,65 bilhões (IBRAFLOR, 2017).

2.5 Gérbera

A primeira descrição botânica da gérbera foi publicada por Joseph Dalton Hooker em 1889, descrevendo a *Gerbera jamesonii*, uma espécie sul africana. O nome da planta foi atribuído pelo naturalista holandês Jan Frederik Gronovius, em

1737, em homenagem ao médico alemão naturalista Traugott Gerber (HANSEN, 1985). O centro de origem compreende a África do Sul, Madagascar e Ásia tropical.

A gérbera é também conhecida como margarida da África ou margarida-do-transvaal, por se encontrar na região Transvaal. Esta planta herbácea pertence à família Asteraceae (CARDOSO e SILVA, 2013) sendo considerada uma das maiores famílias de plantas com flores (angiospermas), possuindo cerca de 22.000 espécies, com diferentes tipos de inflorescência (TEERI et al., 2006). Esta planta ornamental é da mesma família do girassol e das margaridas sendo cultivadas em grandes quantidades e muito apreciadas em arranjos ornamentais (NUNES, 2008).

O nome vulgar gérbera é utilizado tanto para designar as espécies do gênero como às suas flores, que em geral são comercializadas sob esta designação, muitas vezes seguidas de uma indicação específica ou varietal (por exemplo: gérbera-do-transvaal ou gérbera-púrpura) (NUNES, 2008).

Os cultivares mais comumente cultivadas são híbridos entre a *Gerbera jamesonii* e *G. viridifolia*, outra espécie sul-africana. O resultado da hibridação é conhecido por *Gerbera hybrida*, sendo que existem inúmeras cultivares com uma grande variabilidade nas características florais, apresentando diferentes tamanhos e formas da flor e com cores que vão do branco ao amarelo, laranja, vermelho, rosa e púrpura (HANSEN, 1985; OLDONI, 2009).

O cultivo de gérberas em vaso ou para corte, ganhou importância econômica nos últimos anos, a qual vem se destacando como cultura promissora (GUERREIRO et al., 2013), pela extensa variedade de cores e formas disponíveis (LONGCHAR & KEDITSU, 2013) e pelo cultivares disponíveis no mercado (LUDWIG et al., 2007). Na natureza é possível encontrar, coloração diversificada de gérberas, que variam do vermelho ao branco (Figura 1). Porém com desenvolvimento de cultivares híbridas, é possível acesso a uma variada gama de cores (INFOAGRO, 2005).

O diâmetro das flores varia de 6,0 cm a 10,5 cm e as hastes de 30,5 a 46,0 cm. (INFROAGRO, 2006). Espécies selvagens e cultivares de gérberas desenvolvidas no início foram melhor adaptadas para flor de corte devido a hastes longas. A primeira cultivar selecionada para desenvolvimento em vaso foi introduzida no Japão, início de 1980, representando importante avanço da cultura (ROGERS e TJIA, 1990). Algumas cultivares de gérberas em vasos foram desenvolvidas para produção em vasos de 15 cm de diâmetro ou menores. Portanto, essas cultivares

produzem plantas compactadas e flores com pedúnculos curtos, com menos de 30 cm de altura (DOLE e WILKINS, 1999). Nos cultivos em vasos, busca-se elevado número de hastes com grande diâmetro de inflorescências, porte baixo e adequada arquitetura da planta com equilibrada relação entre hastes florais e folhas (LUDWING et al., 2010).

Atualmente as empresas investem na obtenção de cultivares de cores branca, vermelha, pink, rosa, salmão, laranja, bicolors e as tradicionais amarelas com centro amarelado com variações de marrom (BALL HORTICULTURAL, 2016).



Fonte: Ralston Florist (2013).

Figura 1. Diversidade de cores de *Gerbera jamesonii*.

O valor comercial das gérberas é determinado pelas características, como a uniformidade de altura, número de flores, ausência de defeitos e ponto de abertura da flor. Os defeitos encontrados, geralmente são causados por fitopatógenos como *Botrytis* (agente causal do mofo cinzento) e por *Sclerotinia* além de pragas (COOPERATIVA VEILING HOLAMBRA, 2016). Os fatores ambientais como altas temperaturas, no momento do plantio e da irrigação, podem proporcionar desequilíbrio entre a parte aérea e as raízes da planta, sobretudo em solos pesados, onde o florescimento pode ser mais lento. Já as baixas temperaturas no inverno podem provocar anomalias e abortos florais, devido às deficiências fotossintéticas e

à baixa absorção de nutrientes pelas raízes (INFOAGRO, 2006). Assim, a temperatura ideal diurna está entre 25 a 27°C e noturnas de 15 a 16°C (LEITE, 2006).

Outro fator importante no cultivo é a luminosidade sendo que a quantidade de luz (iluminância) deve estar entre 40.000 e 45.000 lux (GUERRERO et al., 2013), com a máxima em 60.000 lux. O processo de formação de botões ocorre quando as plantas recebem elevada luminosidade e diretamente na sua coroa e a baixa luminosidade pode causar atraso no florescimento prolongando o ciclo (BALL HORTICULTURE, 2006). De acordo com Mercúrio (2004), a gérbera é um gênero de florescimento contínuo, quando cultivada em estufa, sendo que sua produção depende da quantidade de luz solar e da temperatura.

O cultivo da planta pode durar vários anos, mas, comercialmente, isso não é interessante, visto que ocorre uma diminuição da produção de flores. Em decorrência disso, as plantas são cultivadas por dois ou três anos em áreas comerciais (PENNINGSFELD e FORCHTHAMMER, 1980)

2.6 Doenças associadas ao cultivo

Os patógenos mais comuns na cultura são *Botrytis cinerea* (mofo cinzento), oídio e *Pythium*, prejudiciais ao desenvolvimento das plantas (TOMBOLATO et al., 1995) e a sua comercialização (MERCURIO, 2000).

2.6.1 *Botrytis cinerea*

O fungo *B. cinerea* pertence à família Sclerotiniaceae e ordem Helotiales, sendo responsável por causar uma doença com diversos nomes: podridão cinzenta dos vegetais, podridão-da flor, mofo-cinzento, podridão-cinza-do-capítulo. O fungo pode causar danos em todas as partes da planta e a infecção pode se iniciar nas pétalas das flores e progredir para folíolos e, posteriormente, para ramos e frutos (SOMMERS, 2010).

O desenvolvimento e disseminação do *B. cinerea* é favorecido por ambientes com precipitação pluviométrica elevada e alta umidade relativa do ar (VALE et al., 2004).

Para ocorrer a infecção, o patógeno, necessita de temperatura entre 18 °C e 23°C, sendo que temperaturas acima de 24°C inibem a germinação dos conídios (VALE et al., 2004). As manchas da doença nas folhas apresentam coloração pardo-acinzentada, com tamanhos e formatos variáveis, podendo ou não exibir halos concêntricos. Em algumas situações observa-se a seca e necrose de pontas e bordas de folhas (Figura 2).



Fonte: do próprio autor.

Figura 2. Sintomas de mofo cinzento causado por *Botrytis cinerea* em folhas de gérbera.

A principal forma de controle do mofo cinzento é o controle químico, o que acabou gerando o surgimento de resistência do fungo a alguns agrotóxicos. Em 1996, Ghini relatou a ocorrência de resistência de *B. cinerea* isolados de cebola, berinjela, morango, crisântemo, batata e roseira (em áreas comerciais); ciclame, violeta, begônia, pimentão (em estufas) e de tomate cereja (cultivo hidropônico), especialmente ao benomyl e ipridione.

Atualmente, a prevenção à resistência está sendo buscada por meio do manejo integrado. Nesse contexto, são preconizadas medidas como uso de

variedades resistentes, rotação de culturas, métodos culturais, físicos e métodos biológicos de controle (SOUZA e REZENDE, 2003).

O controle biológico há muitos anos tornou-se frutífero campo de pesquisas; e, apresenta excelentes resultados, como produtos comerciais formulados à base de *Trichoderma harzanium* (HARMAN, 2000), *Bacillus* spp., fungos leveduriformes entre outros (BETTIOL et al, 2012). Esses produtos têm sido empregados agricultores familiares, que utilizam este sistema de cultivo com maior aproveitamento dos recursos naturais à sua disposição e de forma eficiente na inibição do desenvolvimento de vários fungos fitopatogênicos, sem provocar efeitos indesejáveis ao ambiente (BETTIOL, 1991).

Outro método que pode ser utilizado para o controle de *B. cinerea* bem como de outros fitopatógenos, é o uso de aplicações de bioformulado. Os bioformulados são preparados a base de carvão moído, leite cru, farelo de casca de ovos, com ou sem adição de esterco de gado em fermentação aeróbica induzida ou por anaerobiose. Nestes bioformulados pode-se adicionar também os extratos aquosos de plantas medicinais ou a própria planta que apresentam em sua composição, metabolitos secundários com atividade antimicrobiana.

Assim, pesquisas têm sido realizadas visando obter extratos e bioformulados eficientes para o controle de doenças em plantas de modo a não agredir ao meio ambiente, seres humanos e animais.

3 REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. **Clonagem e Doenças do Eucalipto**. Viçosa, UFV, 2009.
- BALL HORTICULTURAL. **Informações culturais de gébera em vaso**. Disponível em <http://www.ball.com.br/SS-Kieft-Catalog-2016.pdf>. Acesso 13/08/2017.
- BENERAGAMA, C. K.; PEIRIS, S. E. Research and development and innovations in floriculture: lessons from the Market giants for developing countries like Sri Lanka. **Acta Horticulturae**, 2016.
- BETTIOL, W.; TRATCH, R. GALVÃO, J.A.H. **Controle de doenças de plantas com biofertilizantes**. Jaguariúna: EMBRAPA – CNPMA, 22 p., 1998.
- BETTIOL, W. **Componentes do controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA – CNPMA, n. 15, p. 1-5, 1991.
- BILLMANN, B. Development of the Organic Ornamentals sector worldwide. 16 IFOAM Organic World Congress, Modena, Italy, June 16-20, 2008.
- BIZI, R. M. Alternativas de controle do mofo cinzento e do oídio em mudas de eucalipto. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006
- CARDOSO, J.C.; SILVA, J.A.T. Gerbera micropopagation. **Biotechnology Advances**, v.31, n.8, p. 1344-1357, 2013.
- COOPERATIVA VEILING HOLAMBRA. Padrão de qualidade de gébera devasso, 2016. Disponível em [http://veiling.com.br/uploads/padrão qualidade/critérios/gérbera-vaso-pote.14.pdf](http://veiling.com.br/uploads/padrão%20qualidade/critérios/gérbera-vaso-pote.14.pdf). Acesso 15/09/2017.
- DEL, C.; SINGH, D. Floriculture industries, opportunities and challenges in Índia hills. **Internacional Journal of Horticulture**, v.6, n.13, p1-9, 2016
- DOLE, J.M.; WILKINS, HF.1999. Gerbera In: Dole and Wilkins (ed.) **Floriculture, principles and species**. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, 1999.
- GHINI, R. **Ocorrência de resistência a fungicidas em linhagens de *Botrytis cinerea*, no Estado de São Paulo**. Jaguariúna: EMBRAPA – CNPMA, 4 p., 1996.
- GUERREIRO, A. C.; FERNANDES, D. M.; LUDWING. F.; LATORRE, D. O. Production and quality of potted gerbera grown with chloride and potassium silicate. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 29, n. 4, p. 903-909, 2013.
- HANSEN, H. A taxonomic revision of the genus *Gerbera* (Compositae, Mutisieae) sections *Gerbera*, *Parva*, *Piloselloides* (in Africa), and *Lasiopus*. **Opera botanica**, p. 78, 1985.

HANSEN, U.; SCHRADER U. **a modern model of consumption for a sustainable society**. Journal of Consumer Policy, 20: 443-468, 1997.

HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, n. 84, p. 377-393, 2000.

IBRAFLOR – Instituto Brasileiro de Floricultura. Mercado de flores prevê crescimento médio de 9% no Brasil e faturamento de R\$ 7 bi, em 2017. IBRAFLOR, 2017. Disponível em: ibraflor.com/site/2017/11/04/mercado-de-flores-vera-longuini/. Acessado em: 02/03/2018.

IBRAFLOR – Instituto Brasileiro de Floricultura. Release Imprensa. Kess Schoenmaker. 2015. Disponível em: <http://www.ibraflor.com/publicacoes/vw.php?cod=235>. Acesso em: 05/08/2018.

INFOAGRO. **El cultivo de la gerbera**. 2006. Disponível em: www.infoagro.com>. Acesso em: 18 jun. 2017.

INFORME PARANÁ COOPERATIVO. Diversificação: pequenos produtores ampliam cultivo de flores. Ed. n. 3756, janeiro, 2016. Disponível em: paranacooperativo.coop.br/ppc/index.php/sistema-ocepar/comunicacao/2011-12-07-11-06-29/informe-parana-cooperativo-arquivo/archive/view/listid-3-informe-parana-cooperativo-arquivo/mailid-2171-informe-parana-cooperativo-online-edicao-n-issuenb/tmpl-component. Acesso em: 17/08/2017.

JUNQUEIRA, A.H.; PEETZ, M.S. O setor produtivo de flores e plantas ornamentais no Brasil, no período de 2008 a 2013: atualizações, balanços e perspectivas. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 20, n.2, p. 11-120, 2014.

KEDITSU. R. *Gerbera*: Soil fertility and plant nutrition. **Scientific Journal of Agricultural**, n. 2, v. 3, p. 97-114, 2013.

LEITE, C. A. **Utilização de malhas coloridas na produção de flores de alta, média e baixa exigência em radiação solar**. Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. 116 p. 2006.

LONGCHAR, A; KEDITSU, R. Flower yield vase life of *Gerbera* in response to planting time and organic manures on Alfisol. **Scientific Journal of Agricultural**, v.2, n.3, p.124-128, 2013.

LUDWIG F. 2008. **Cultivares de gérbera (*Gerbera jamesonii* L.), em vaso, sob dois níveis de fertirrigação**. Botucatu: UNESPFCA. 79p. (Dissertação de mestrado).

LUDWIG, F; FERNANDES. D. M.; MOTA, P. R. D.; BOAS. R. L. Crescimento e produção de gérbera fertirrigada com solução nutritiva. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n. 4, p. 424-429, out/dez., 2010.

MERCURIO, G. Gerbera Cultivation in greenhouse. **The Netherlands: Shereurs** p. 206, 2002.

MERCURIO, G. La coltivazione della Gerbera in Coltura Protetta. **Shereurs**, 2000.

NUNES, R.C. **Cultura do tecido**. Dissertação de Mestrado. 50 p. Área de Concentração: Agronomia, Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, 2008.

OLDONI, C.M. Produção de gérberras. **Informe Agropecuário**, n. 30, p. 67-73, 2009.

PENNINGSFELD, F.; FORCHTHAMMER, L. **Gerbera. Stuttgart: Ulmer Fachbuch**, 1980. 342p.

RALSTON FLORIST (2013)

ROGERS, M.N.; TJIA, B.O. Gerbera production. **Timber Press Growers handbook series**, Portland, Oregon. v.4, p.116, 1990.

SAHA, T. N; MAJUMDER, J; KADAM, B. G; KUMAR, G; TIWARI, K. A; GIRISH, S. K; KUMAR, R. Role of all India coordinated research Project in development of floriculture in India. **International Journal of Bio-resource and Stress Management**, n. 5, v. 1, p. 159-165, 2014.

SCHIMMENTI, E.; GALATI, A.; BORSELLINO, V.; IEVOLOLI, C.; IEVOLI, C.; LUPI, C.; TINERVIA S. Behavior of consumers of conventional and organic flowers and ornamental plants in Italy. **Horticultural Science**, 40, p. 162-171, 2013.

SEBRAE. Flores plantas ornamentais do Brasil volume 1 série estudos mercadológicos. **|O mercado brasileiro de flores e plantas ornamentais**. 2015 Disponível em [http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/7ed114f4eace9ea970dadf63bc8baa29/\\$File/5518.pdf](http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/7ed114f4eace9ea970dadf63bc8baa29/$File/5518.pdf)>Acesso em: 07/09/2017.

SMORIGO, J.N.; SAWAYA, M.J. **Análise da eficiência dos sistemas de distribuição de flores e plantas ornamentais no Estado de São Paulo**. Revista de Economia e Sociologia Rural, Brasília, v. 39, p.35-52, 2001.

SOMMERS, Brian J. Geografia do Vinho. São Paulo: Novo Século, 2010.

SOUZA, J. L. de; RESENDE, P. **Manual de Horticultura orgânica. Viçosa: Aprenda Fácil**, 2003. 564 p.

TEERI, T. H.; ELOMAA, P.; KOTILAINEN, M.; ALBERT. V. A Mining plant diversity: gerbera as a model system for plant developmental and biosynthetic research. **BioEsseys**, v. 28, n. 7, p. 756-767, 2006.

TOMBOLATO, A. F. C., QUIRINO, E. A., COSTA, A. M. M. Antúrio (*Anthurium andraeanum*). In: TOMBOLATO, A.F.C.; COSTA, A.M.M. (eds.). **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Agrônômico, 1998. p. 18-21. (Boletim Técnico 174).

VALE, F. X. R.; ZAMBOLIN, L.; ZAMBOLIM, E. M.; ALVARENGA, M. A. R. Manejo integrado das doenças do tomateiro: epidemiologia e controle. Lavras: UFLA, 2004.

CAPÍTULO 1

Controle alternativo de mofo cinzento (*Botrytis cinerea*) em gérberas
(*Gerbera jamesonii*)

Controle de mofo cinzento (*Botrytis cinerea*) em gérberas (*Gerbera jamesonii*) por extrato aquoso de capim-limão e bioformulado

RESUMO

Dentre as diversas plantas ornamentais cultivadas no Brasil e no mundo, a gérbera (*Gerbera jamesonii*) se destaca devido a sua beleza e exuberância de cores o que atrai os consumidores. Com isto, a demanda por esta planta tem aumentado acarretando em aumento do seu cultivo. Um dos grandes desafios da produção dessa flor está relacionado ao controle de doenças, dentre elas o mofo cinzento causada pelo *Botrytis cinerea*. Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi avaliar *in vitro* e *in vivo* a atividade fungitóxica do extrato aquoso bruto (EBA) de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) e de um bioformulado sobre o desenvolvimento do *B. cinerea* e o controle da doença. Como testemunha, utilizou-se água destilada e o fungicida de contato Mancozeb. Os tratamentos foram adicionados ao meio de cultura BDA ainda fundente, sendo em seguida vertidos em placas. Após a solidificação, um disco de micélio do fungo foi colocado no centro de cada placa. As medições do crescimento micelial foi realizada a cada três dias e no último dia, fez-se a contagem do número de esporos. Os tratamentos com EBA 20% e as três concentrações de bioformulado foram os mais eficientes em inibir o crescimento micelial e a esporulação. No experimento em casa de vegetação, as plantas foram inoculadas e após sete dias foi realizado a aplicação dos tratamentos, quando surgiram os primeiros sintomas. A avaliação do diâmetro da lesão foi realizada a cada quatro dias e com os dados calculou-se a área abaixo da curva do progresso da doença (AACPC). Os resultados mostraram que as plantas tratadas com EBA, nas três concentrações e bioformulado 5 e 20%, foram os mais eficientes para controlar a doença em casa de vegetação.

Palavras-chave: Mofo cinzento. Planta ornamental. Esporulação. Diâmetro de lesão

Control of gray mold (*Botrytis cinerea*) in gerbera (*Gerbera jamesonii*) by aqueous extract of lemongrass and bioformulated

ABSTRACT

Among the various ornamental plants grown in Brazil and in the world, *Gerbera jamesonii* stands out due to its beauty and exuberance of colors which attracts consumers. With this, the demand for this plant has increased, causing an increase in its cultivation. One of the great challenges of the production of this flower is related to the control of diseases, among them the gray mold caused by *Botrytis cinerea*. In view of the above, the objective of this work was to evaluate in vitro and in vivo the fungitoxic activity of the crude aqueous extract (CAE) of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) and a bioformulated on the development of *B. cinerea* and control of the disease. As a control, distilled water and the Mancozeb contact fungicide were used. Treatments were added to the PDA culture medium still flux, and then poured into plates. After solidification, a mycelial disc of the fungus was placed in the center of each plate. Measurements of mycelial growth were performed every three days and on the last day, the number of spores was counted. The treatments with 20% CAE and the three concentrations of bioformulated were the most effective in inhibiting mycelial growth and sporulation. In the greenhouse experiment, the plants were inoculated and after seven days the treatments were applied, when the first symptoms appeared. The evaluation of the lesion diameter was performed every four days and with the data the area under the disease progression curve (AUDPC) was calculated. The results showed that the plants treated with CAE in the three concentrations and bioformulated 5 and 20% were the most efficient to control the disease in greenhouse.

Keywords: Gray mold. Ornamental plant. Sporulation. Diameter of the leaf lesion

1 INTRODUÇÃO

A exploração econômica de flores é recente no Brasil, porém, o setor tem apresentado movimentação financeira considerável devido ao elevado potencial para a produção de flores e folhagens, à grande variabilidade do clima, vasta disponibilidade de água, umidade relativa do ar apropriada e imenso espaço territorial que o Brasil apresenta (BERNARDES, 2011).

O mercado de plantas ornamentais tem obtido interesse significativo com posições relevantes no agronegócio nacional no Brasil e no mundo.

Além de ser uma atividade de destaque econômico crescente e com potencial para expansão futura, o cultivo de plantas ornamentais é considerado uma das principais atividades geradoras de emprego, ocupação e renda para pequenos e microempreendedores em todo país, com importantes parcerias femininas em áreas rurais (JUNQUEIRA et al., 2014).

No mundo todo, 171 países exercem floricultura (DEL & SINGH, 2016), dentre os quais, Holanda se destaca como país produtor e comercializador, seguido pela China, Índia, Estados Unidos e Japão. Há outros polos de produção que impulsionam o mercado internacional, tais como Colômbia, Quênia, Equador e Etiópia (IBRAFLOR, 2015). No ano de 2013 a floricultura obteve crescimento significativo nas exportações globais atingindo U\$\$ 21,6 bilhões e apresentando aumento de 22% nos últimos cinco anos (BENERAGAMA & PEIRIS, 2016).

No Brasil, a floricultura movimenta cerca de 700 a 800 milhões de dólares por ano, sendo responsável pela geração de aproximadamente, 50 mil empregos, dos quais 45% estão localizados na produção, 7% na distribuição, 45% no comércio e 4% no apoio (IBRAFLOR, 2015).

A gérbera (*Gerbera jamesonii* Adian), tem se destacado devido ao rápido aumento que o consumo apresentou em muitos países (AIPH, 2008), o que é muito promissor para a atividade agrícola. Esta flor está entre as flores mais plantadas no Brasil, cultivada como flor de corte ou de vaso. O cultivo dessa espécie ornamental representou um crescimento de 20% em 2008, gerando emprego e renda à muitos trabalhadores e produtores rurais (LUDWIG et al., 2008).

Um dos grandes desafios enfrentados pelo setor de flores de corte, como as gérberas é manter a qualidade de flores produzidas as quais são frequentemente

acometidas por doenças. Essas doenças causam inúmeros danos ao produto final, levando à queda de produtividade e consequente prejuízo na comercialização. Dentre os principais patógenos que causam doenças na cultura das gérberas está o fungo *Botrytis cinerea*, agente causal da doença mofo cinzento, a qual causa danos severos à cultura (DIAS-TAGLIACOZZO e CASTRO, 2002).

Para controlar a doença, a maioria dos produtores emprega pulverizações com altas concentrações de princípios ativos no sistema convencional de produção, utilizando agroquímicos de síntese, gerando intoxicações, contaminação dos solos, das águas e dos alimentos. Sendo assim, produtos alternativos, como extratos botânicos, foram investigados, por serem de origem natural e menos tóxicos ao homem e ao meio ambiente (STANGARLIN et al., 1999).

Um desses produtos alternativos no controle de doenças são os bioformulados. A matéria orgânica utilizada na produção de bioformulados tem se destacado como um eficiente pesticida, tanto por incorporação no solo, como por transformação para posterior uso, devido à fermentação anaeróbica obtida pelo esterco de gado. Outro produto alternativo que também tem tido relatos positivos de controle é o extrato de capim-limão (*Cymbopogon citratus*), em concentrações adequadas tem garantido a eficiência do produto no controle alternativo de doenças em plantas (SOUZA & RESENDE, 2003).

Assim, o trabalho teve como objetivo analisar a eficácia de extratos aquosos de capim limão e de um bioformulado à base de resíduos orgânicos, no controle de *Botrytis cinerea* na cultura de gérbera em casa de vegetação e no controle do crescimento *in vitro* do patógeno.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados *in vitro*, no Laboratório de Controle Alternativo e *in vivo*, em casa de vegetação, do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Maringá. Em ambos os experimentos, foram utilizados os seguintes tratamentos: Extrato bruto aquoso (EBA) de capim-limão nas concentrações de 5%, 10% e 20%; bioformulado a base de capim-limão, nas mesmas concentrações; fungicida (Mancozeb) e água, como controle

2.1 Preparo dos tratamentos

O EBA de *C. citratus* foi obtido de folhas e ramos da própria planta de capim-limão, coletadas no período da manhã em áreas de cultivo em Maringá, entre os meses de fevereiro a junho. Para o preparo do EBA, 200 g de folhas frescas foram trituradas em 200 mL de água destilada e coados em gaze. O extrato resultante foi armazenado em vidro âmbar, no escuro e temperatura de geladeira (aproximadamente 4 °C), durante 15 dias até o momento de uso.

O bioformulado foi preparado no Laboratório de Controle Alternativo da Universidade Estadual de Maringá e é composto por capim-limão picado, cinzas, casca de ovos, farinha de osso e água, em fermentação com indução microbiana em anaerobiose, por 25 dias.

2.2 Obtenção do isolado de *Botrytis cinerea*

O isolado de *B. cinerea* foi obtido a partir dos sinais do patógeno observado nas folhas de gérberas com a doença. Com a utilização de uma alça de repicagem, as estruturas do fungo foram retiradas e colocadas em placas de Petri contendo meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA).

Para comprovar a patogenicidade do fungo, folhas das mudas de gérbera previamente feridas com agulha foram inoculadas com discos de micélio de BDA de 7 mm de diâmetro contendo o micélio de *B. cinerea* isolado daquelas plantas com sintomas. As colônias inoculadas apresentavam sete dias de idade. As plantas inoculadas permaneceram em câmara úmida onde observou-se o desenvolvimento

da doença (Figura 1). Comprovada a patogenicidade do isolado, o mesmo foi reisolado em BDA e utilizado nos experimentos *in vitro* e em casa de vegetação.



Figura 1. A - Inoculação de *Botrytis cinerea* nas folhas de gérbera. B - Fixação dos discos de micélio com fita adesiva. C - Câmara úmida. D - Gérberas com primeiros sintomas. Fonte: próprio autor

2.3 Avaliação do crescimento micelial e esporulação de *Botrytis cinerea*

Em laboratório, o experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, com 8 tratamentos e 5 repetições. Os tratamentos foram incorporados em meio de cultura BDA de maneira a se obter as concentrações de 5%, 10% e 20% do EBA e bioformulado, esterilizados a 121°C por 20 min e vertidos em placas de Petri. O fungicida foi adicionado ao meio de cultura esterilizado e ainda fundente (temperatura de aproximadamente 45°C).

Após a completa solidificação do meio de cultura com os tratamentos, foi realizada a transferência de um disco de micélio (7 mm de diâmetro) de *B. cinerea* para o centro de cada placa. As placas foram vedadas com filme plástico e mantidas em estufa incubadora BOD a 28°C ± 2°C e fotoperíodo de 12 horas. A avaliação do crescimento micelial foi realizada através de medições a cada três dias, do diâmetro

das colônias, obtida pela média de duas medidas diametralmente opostas, e perdurou até o momento em que as colônias fúngicas no tratamento controle cobriram toda a superfície do meio de cultura, o que ocorreu no 12º dia após a repicagem. Nesse momento, também se realizou a contagem de esporos. Para isso, foram adicionados 10 mL de água destilada esterilizada em cada placa e realizada a raspagem com um pincel para facilitar a liberação dos conídios. A suspensão obtida foi filtrada em gaze e a contagem realizada em câmara de Neubauer.

Com os dados obtidos calculou-se a Área Abaixo da Curva do Crescimento Micelial (AACCM) com a seguinte fórmula: $AACCM = ((y_i + y_{i+1})/2 \cdot dt_i)$, onde y_i e y_{i+1} são os valores de crescimento da colônia observados em duas avaliações consecutivas e dt_i o intervalo entre as avaliações (BELAN, 2005; BROETTO et al, 2015) e para a inibição do crescimento micelial (PIC) utilizou-se a fórmula $PIC = ((\text{Crescimento da testemunha} - \text{Crescimento tratamento})/(\text{Crescimento da testemunha})) \times 100$.

O experimento foi realizado em duplicata e os resultados estão apresentados como a média dos experimento 1 e 2.

2.4 Casa de vegetação

O experimento iniciou na UNINGÁ – Centro Universitário Ingá, com o recebimento das mudas e aclimatação. As mudas de gérberas da cultivar Revolution Yellow DC, lote 216691-52-06, foram adquiridas da empresa Ball Seeds em bandejas com 110 células. Essa cultivar possui a cor da flor alaranjada. As mudas foram transplantadas em fevereiro de 2017, quando apresentavam quatro folhas definitivas, para vasos plásticos (número 14, cor preta, marca Nutriplant modelo Holambra) com capacidade de 1 L preenchidos com 500 mL de substrato comercial Mec Plant.

Após o transplante, os vasos foram inicialmente acomodados em lajotas, distanciados 25 cm uns dos outros. As plantas foram aclimatadas por 15 dias e irrigadas duas vezes ao dia, manualmente, com auxílio de mangueira acoplado com jato distribuidor. Após 7 dias, notou-se excesso de umidade inicial sendo, a partir deste momento, adotada uma rega diária para ajustar a umidade.

No período de aclimação as mudas ficaram em estufa coberta com malha preta de sombreamento de 50%. Após o período de aclimação, houve substituição da malha preta por malha termo refletora 50%, para a condução das fases de desenvolvimento e término da cultura.

A adubação complementar foi realizada a partir do sétimo dia após o transplante, com o formulado comercial Peters NPK 9-45-15, na dosagem de 1,5 g/L. A aplicação foi realizada via substrato conforme orientação Ball Seeds, utilizando uma bomba estacionária na quantidade de 100 mL de solução nutritiva por planta.

Quando as plantas apresentavam as folhas definitivas totalmente abertas, os vasos foram transferidos para a casa de vegetação na Universidade Estadual de Maringá (UEM) (latitude 23°24'80"S e longitude 51°56'70"O), com temperatura e climatização iguais a inicial, mas agora em bancadas (Figura 2). A inoculação foi realizada logo em seguida.



Figura 2. Vasos com gérberas em bancadas em ambiente protegido localizado na Universidade Estadual de Maringá (UEM-DAG). Fonte: próprio autor

A inoculação de *B. cinerea* nas folhas das gérberas, foi por ferimentos feitos na superfície das folhas e em seguida, a deposição de um disco de micélio (seis mm de diâmetro) com cinco dias de idade, fixados por fita adesiva durex no local do ferimento. Após sete dias da inoculação, surgiram os primeiros sintomas da doença e iniciou-se a aplicação dos tratamentos em toda a planta. Para aplicação dos tratamentos, utilizou-se borrifadores para cada dosagem e tratamento.

Os sintomas foram observados foram o escurecimento da área inoculada e adjacências; presença de abundante micélio aéreo de cor acinzentada nas partes lesionadas das folhas. Nestas lesões, notou-se a presença de frutificações (conidióforos e conídios) nas faces abaxial e adaxial das folhas, facilmente observados em microscópio estereoscópico.

Aos quatro dias após os tratamentos iniciaram-se as avaliações dos diâmetros das lesões nas folhas, com a medição horizontal e vertical de duas lesões, medidas em duas folhas diferentes de cada vaso. A média dessas lesões foi utilizada como valor da medida da lesão da repetição. A partir desse momento, as avaliações foram realizadas de quatro em quatro dias, totalizando quatro avaliações de severidade

Para o diâmetro das lesões foi calculada a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), calculada pelo programa Win AACPD (BELAN, 2005).

Ao final das avaliações, as folhas com diferentes níveis de doença, foram fotografadas para que fosse possível fazer a escala diagramática da doença, especificado no Capítulo 2 dessa dissertação. Após tiradas as fotos, foram avaliadas a massa fresca, onde as folhas foram pesadas logo que cortadas da planta, e a massa seca, onde as mesmas foram colocadas em estufa a 100°C por 24 horas, a fim de se retirar toda água presente nas folhas.

O experimento foi em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 8 tratamentos e 5 repetições, sendo que cada vaso, com uma planta consistiu a repetição. O experimento foi realizado duas vezes.

2.5 Análise dos dados

Os dados obtidos foram submetidos aos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade (Teste de Levene) a fim de verificar os pressupostos básicos para a análise de variância. A transformação da raiz quadrada foi utilizada quando necessário.

Após as transformações, foi realizada a análise de variância comparando-se as médias pelo teste de agrupamento de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, através do software Sisvar (FERREIRA, 2008).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação do crescimento micelial e esporulação de *Botrytis cinerea*

A transformação dos dados utilizando a raiz quadrada foi necessária para a análise dos dados do diâmetro das colônias (crescimento micelial - cm) e esporulação do patógeno. Assim, os dados passaram a apresentar os pressupostos básicos para a análise de variância: normalidade e homogeneidade. A análise de variância do experimento mostrou que houve diferença entre os tratamentos para a variável crescimento micelial. Assim, o teste de agrupamento de médias de Scott-Knott foi aplicado aos dados, a 5% de probabilidade

A média dos experimentos do crescimento micelial mostrou que as três concentrações do bioformulado foram eficientes em inibir o crescimento *in vitro* de *B. cinerea* (Tabela 1). Entretanto, os EBA's de capim-limão nas concentrações 10 e 20% também não diferiram estatisticamente do bioformulado nas três primeiras avaliações, mostrando a capacidade do capim-limão em controlar o crescimento do fungo. Na última avaliação, doze dias após a repicagem, somente o capim-limão 20% se mostrou tão eficiente quanto as concentrações de bioformulado no controle do fitopatógeno *in vitro*, apresentando valores de inibição superior ao fungicida.

Trabalhos na literatura mostram a capacidade de extratos vegetais e óleos essenciais feitos com capim-limão no controle de fungos, sendo que a utilização de produtos alternativos como esses é uma alternativa viável para a agricultura orgânica (STARGARLIN et al., 2007).

Tabela 1. Crescimento micelial (cm), porcentagem de inibição do crescimento (PIC) e Área abaixo da curva do crescimento micelial (AACCM) de *Botrytis cinerea** na presença de diferentes concentrações de extrato bruto aquoso (EBA) de capim-limão e do bioformulado.

Tratamentos	3 Dias	6 Dias	9 Dias	12 Dias	PIC	AACCM
Água (Testemunha)	1,18 c	1,38 c	2,81 b	2,70 d	-	19,01 c
Fungicida	0,78 b	1,03 b	1,19 a	1,38 b	48,88	7,36 b
EBA capim-limão 5%	0,75 b	0,97 b	1,63 a	2,16 c	20,00	1,50 a
EBA capim-limão 10%	0,72 a	0,76 a	0,92 a	1,51 b	44,07	1,50 a
EBA capim-limão 20%	0,70 a	0,70 a	0,75 a	0,89 a	67,03	1,50 a
Bioformulado 5%	0,70 a	0,70 a	0,70 a	0,70 a	74,07	6,23 b
Bioformulado 10%	0,70 a	0,70 a	0,70 a	0,70 a	74,07	3,10 a
Bioformulado 20%	0,70 a	0,70 a	0,70 a	0,70 a	74,07	1,72 a
CV (%)	6,2	15,99	60,8	26,72	-	41,46

Dados transformados pela raiz quadrada e submetidos ao teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, na coluna Média de dois experimentos

Lorenzetti et al. (2011) relatam que o capim-limão possui alguns componentes químicos, mais conhecidos como monoterpenóides, que possivelmente podem ter ação fungicida no controle de *B. cinerea*. Guimarães et al. (2011) também verificaram que a aplicação *in vitro* do óleo essencial de capim-limão inibiu 100% o crescimento micelial de *B. cinerea*. A inibição do crescimento micelial *in vitro* de *B. cinerae* também foi verificado por Mbili et al (2017) utilizando óleos essenciais (OE) de capim-limão e de *Citrus*. Os OE foram acrescidos ao BDA ainda fundente de modo a obterem as concentrações de 1,5 a 60%. As medições do crescimento micelial foram diárias e com os dados calcularam o PIC verificando que o OE de capim-limão inibiu completamente o crescimento do fungo

Itako et al (2009) avaliaram a fungitoxidade *in vitro* dos extratos brutos aquosos (EBAs) de *Achillea millefolium* (mil-folhas), *Artemisia camphorata* (canfora), *Cymbopogon citratus* (capim-limão) e *Rosmarinus officinalis* (alecrim) contra *Cladosporium fulvum*. Os EBA's foram incorporados ao meio de cultura BDA para se obter as concentrações de 1%, 10%, 20% e 40%. Estes autores avaliaram a inibição do crescimento micelial e verificaram que os EBAs inibiram o crescimento micelial

sendo que para a planta *C. citratus* a maior inibição foi em 40,67% do EBA, inibindo 20,03% do crescimento micelial em relação à testemunha. Os resultados mais expressivos foram obtidos com os EBAs de *A. camphorata* e *R. officinalis*, que inibiram em 53,42% e 49,06%, respectivamente, o crescimento micelial do fitopatógeno

Em relação à esporulação de *B. cinerea* (Tabela 2), a análise de variância do experimento também mostrou que houve diferença entre os tratamentos, assim o agrupamento de médias de Scott-Knott foi aplicado aos dados, a 5% de probabilidade.

Tabela 2 Esporulação (conídios. 10^4 .mL $^{-1}$) *in vitro* de *Botrytis cinerea* na presença de diferentes concentrações de extrato bruto aquoso (EBA) de capim-limão e do bioformulado.

Tratamentos	Esporulação (conídios. 10^4 .mL $^{-1}$)
Água (Testemunha)	1,46 b
Fungicida	0,00 a
Capim-limão 5%	5,07 c
Capim-limão 10%	1,56 b
Capim-limão 20%	0,20 a
Bioformulado 5%	0,00 a
Bioformulado 10%	0,00 a
Bioformulado 20%	0,00 a
CV (%)	109,8

Dados transformados pela raiz quadrada e submetidos ao teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Médias de dois experimentos

A esporulação de *B. cinerea* foi 100% inibida pelos tratamentos com fungicida, bioformulado nas três concentrações e capim-limão a 20% (Tabela 2). Lorenzetti et al. (2011), também relataram que a produção de esporos de *B. cinerea* foi completamente inibida com a utilização de óleo essencial de capim-limão. Carnelossi et al. (2009) avaliaram o efeito dos óleos essenciais (OE) de capim-limão (*C. citratus*), eucalipto (*Corymbia citriodora*), hortelã-doce (*Mentha arvensis*) e estragão (*Artemisia dracunculus*) na esporulação de *Colletotrichum gloeosporioides* em mamão e verificaram que o OE de *C. citratus* foi o mais eficiente, inibindo 100% a esporulação a partir da alíquota de 10 μ L

Ainda com relação a esporulação (Tabela 2), observou-se que o tratamento com EBA de capim-limão a 5%, estimulou a esporulação ($5,07 \times 10^4$ conídios.mL⁻¹). Semelhante a estes resultados Santos Neto et al (2016) observaram estímulo na esporulação e no crescimento micelial de *Septoria lycopersici* quando na presença de EBA de capim-limão na dose de 10 g.L⁻¹ (menor dosagem testada) e atribuíram este efeito ao fenômeno chamado hormese, que se caracteriza pela propriedade de um agente potencialmente tóxico, quando em baixas concentrações, estimular determinado caráter essencial, que no presente trabalho foi a produção dos esporos. Os esporos são a unidade reprodutiva do fungo e necessário a sobrevivência do mesmo.

3.2 casa de vegetação

O teste de Shapiro-Wilk mostrou que não houve normalidade para os valores de diâmetro das lesões e matéria fresca e seca. O mesmo aconteceu com o teste de Levene, que verificou a ausência de homogeneidade das variâncias. Portanto, uma transformação dos dados foi necessária. A partir dos dados transformados, os testes foram reaplicados aos dados. Normalidade e homogeneidade passaram a estar presentes com a transformação da raiz quadrada. Com os pressupostos básicos para a análise de variância atendidos, os dados puderam seguir para a ANAVA.

A análise de variância do experimento mostrou que houve diferença entre os tratamentos para a variável diâmetro da lesão e AACPD. Assim, o teste de agrupamento de médias de Scott-Knott foi aplicado aos dados, a 5% de probabilidade.

Na Tabela 3 observa-se que as plantas tratadas com EBA de capim-limão, nas três concentrações bem como com o bioformulado a 20% apresentaram menor AACPD. O fungicida e bioformulado a 5% apresentaram os maiores valores de Area Abaixo da Curva do progresso da doença mofo cinzento em gérbera.

Tabela 3. Diâmetro médio das lesões (cm) de *Botrytis cinerea* e area abaixo da curva do progresso da doença mofo cinzento (AACPD), em plantas de gérbera tratadas com diferentes concentrações de extrato bruto aquoso (EBA) de capim-limão e bioformulado. Média de dois experimentos.

Tratamentos	11 DAI	15 DAI	19 DAI	23 DAI	AACPD
Água (Testemunha)	1,51 b	2,51 ^{ns}	3,33 ^{ns}	3,59 a	68,56 b
Fungicida	1,44 b	2,50	3,19	3,25 a	73,90 b
EBA Capim-limão 5%	1,68 b	2,32	2,66	2,82 a	37,52 a
EBA Capim-limão 10%	1,73 b	2,31	2,82	2,75 a	38,27 a
EBA Capim-limão 20%	1,75 b	2,25	2,64	2,86 a	35,97 a
Bioformulado 5%	1,55 b	2,58	3,06	3,07 a	44,08 a
Bioformulado 10%	0,88 a	2,39	3,90	4,66 b	67,86 b
Bioformulado 20%	1,58 b	2,42	2,62	2,70 a	36,51 a
CV (%)	25,44	12,98	30,21	27,05	21,48

*NS: não significativo. Dados transformados pela raiz quadrada e submetidos ao teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. DAI=dias após inoculação

Em concordância com este trabalho, Itako et al. (2008) verificaram o efeito de EBA de capim-limão, nas concentrações de 10% e 20%, em plantas de tomate, inoculadas com *Alternaria solani*. Estes autores relatam que houve redução no número de lesões em relação à testemunha, nas folhas acima das tratadas, evidenciando o efeito sistêmico dos extratos. Santos et al. (2013) avaliaram o efeito preventivo e curativo dos OE de capim-limão, citronela, erva-cidreira, hortelã-pimenta e nim em quatro concentrações (2500; 5000; 7500 e 10000 ppm) sobre a helmintosporiose de *Panicum maximum* cv. Tanzânia e verificaram que todos os óleos essenciais e as concentrações reduziram a severidade da helmintosporiose. Já Perina et al. (2013) avaliaram o potencial de OE de citronela, capim-limão, eucalipto, canela e árvore-de-chá e leite de vaca integral (LVI) no controle do oídio da soja (*Erysiphe difusa*) em casa de vegetação e verificaram que os tratamentos LVI (100mL L⁻¹) e OEs de citronela, capim-limão e eucalipto a 1.0mL L⁻¹, apresentaram controle de 67 a 74% da doença.

Ao final dos experimentos, avaliou-se a massa fresca e seca da parte aérea da gérbera. Assim como os dados de diâmetro das lesões, os presentes valores também foram transformados, porém, as variáveis se mostraram não significativas tanto no primeiro, quanto no segundo experimento (Tabela 4).

Tabela 4. Massa fresca (g) e seca (g) de plantas de gérbera, em casa de vegetação.

Tratamentos	Primeiro Experimento		Segundo Experimento	
	Massa Fresca*	Matéria Seca*	Massa Fresca*	Matéria Seca*
Água (Testemunha)	3,97	1,40	3,60	1,58
Fungicida	4,58	1,97	3,76	1,63
EBA Capim-limão 5%	3,94	1,98	4,24	1,88
EBA Capim-limão 10%	3,29	1,49	3,36	1,55
EBA Capim-limão 20%	4,52	1,72	4,67	2,00
Bioformulado 5%	4,41	1,73	3,77	1,67
Bioformulado 10%	4,08	1,59	4,95	1,78
Bioformulado 20%	3,46	1,31	3,93	1,73
CV (%)	20,55	16,74	21,23	30,85

*NS: não significativo. Dados transformados pela raiz quadrada.

4 CONCLUSÕES

O EBA de capim-limão a 20% e o bioformulado, nas concentrações testadas, foram eficientes em inibir o crescimento micelial e a esporulação de *Botrytis cinerea in vitro*.

Em plantas de gérbera, os tratamentos com EBA de capim-limão nas concentrações estudadas e o bioformulado a 5% e 20% foram eficientes em controlar o mofo cinzento.

5 REFERÊNCIAS

- AIPH (2008): **International statistics flowers and plants union fleurs**. Den Haag, 2008.
- ARAÚJO, W. L.; LIMA, A. O. S.; AZEVEDO, J. L.; MARCON, J.; KUKINSKY-SOBRAL, J.; LACAVA, P. T. Manual: isolamento de microrganismos endofíticos. Piracicaba: CALQ, 2002. 86 p.
- BARBOSA JG; MARTINEZ HEP; KÄMPF AN. 1999. Acúmulo de macronutrientes em plantas de crisântemo sob cultivo hidropônico em argila expandida para flor de corte. Pesquisa Agropecuária Brasileira 34: 593-601.
- BELAN, H. C.; RITTER, R. A. O.; FÜRSTENBERGER, A. L. F.; CANTERI, M. G. Win AACPD: *Software para cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença no ambiente Windows*, 2005.
- BELLÉ S. 1998. **Sistemas de irrigação e concentrações de adubação complementar na produção de *Gerbera jamesonii* cv 1187 em vaso**. Porto Alegre: UFRGS. 122p (Tese doutorado).
- BERNARDES, J. **Clima limita produção de rosas no Rio Grande do Sul**. Agência USP de Notícias. 2011.
- BLUMTHAL, M.R.; CLOYD, R.A.; SPOMER, LA.; WARNOCK, D.F. Flower color preference of western flower Thrips. **Horttechnology**, v. 15, n. 4, 2005.
- BROETTO, L; COLTRO-RONCATO, S.; MEINERZ, C. C.; DILDEY, O.D.F.; PAZDIORA, P. C.; GONÇALVES, E.D.V.; MORAES, A. J.; HENKEMEIER, N. P.; KUHN, O. J.; STANGARLIN, J. R. Crescimento micelial e produção de microescleródios de *Macrophomina phaseolina* confrontado com diferentes isolados de *Trichoderma* sp. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 13, p. 310-317, 2014
- CARNELOSSI, P.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S.; ITAKO, A.T.; MESQUINI, R.M. Óleos essenciais no controle pós-colheita de *Colletotrichum gloeosporioides* em mamão. **Rev. Brasileira Plantas Mediciniais**, v.11, p.399-406, 2009
- CHUNG YM; KIM HA; KIM KY; PARK SW; YI YB; LEE JH; KNOW OC. Morphological characteristics and genetic variation of gerbera (*Gerbera hybrida*). **Journal of Plant Biotechnology**, n. 3, p. 145-149, 2001.
- DIAS-TAGLIACOZZO, G.M; CASTRO, C.E.F. **Fisiologia da pós-colheita de espécies ornamentais**. In: WACHOWICZ, C.M.; CARVALHO, R.I.N. (Org.). **Fisiologia Vegetal: produção e pós-colheita**. Curitiba: Champagnat, 2002. p.359-382. (Coleção Agrárias).
- ELAD, Y., GULLINO, M. L., SHTIENBERG, D. AND ALOI, C. Managing *Botrytis cinerea* on tomatoes in greenhouses in the Mediterranean. **Crop Protection** 14, 105-109, 1995.

FAKHRI MN; MALOUPA E; GERASOPOULOS D. Effects of substrate and frequency of irrigation on yield and quality of three *Gerbera jamesonii* cultivars. **Acta Horticulturae**, n. 408, p. 41-45, 1995.

FANELA TLM; MOTA PRD; VILLAS BÖAS RL; LUDWIG F; FERNANDES DM. 2006. Influência de diferentes níveis de tensão de água na cultura da gérbera desenvolvida em substrato. In: MOSTRA CIENTÍFICA EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS, 2.; MOSTRA CIENTÍFICA DA FMVZ, 10.; REUNIÃO CIENTÍFICA EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS DO LAGEADO, 13. Anais... Botucatu: UNESP (CD-ROM).

FERREIRA, D. F. 2000. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45. Anais... São Carlos: UFSCar. p.255-258.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Lavras, v. 6, p. 36-41, 2008.

GUIMARÃES, L. G. L.; CARDOSO, M. G.; SOUSA, P. E.; ANDRADE, J.; VIEIRA, S. S. Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do citral. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, n. 12, p. 464-472, 2011.

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

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, p.75-83, 2009

LANNA FILHO, R.; FERRO, H. M; PINHO, R. S. C. de. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 4, n. 2, p.12, 2010.

LINHARES, A. I., MATSUMARA, A., LUZ, V. Avaliação da amplitude de ação antagonística de microrganismos epífitas do trigo sobre o crescimento radial de *Drechslera tritici-repentis*. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.1, n.3, p.119-126, 1995.

LORENZETTI, E. R.; MONTEIRO, F. P.; SOUZA, P. E.; SOUZA, R. J.; SCALICE, H. K.; DIOGO JR, R.; PIRES, M. S. O. Bioatividade de óleos essenciais no controle de *Botrytis cinerea* isolado de morangueiro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, p. 619-627, 2011.

LYNCH, J.M. In vitro identification of *Trichoderma harzianum* as a potential antagonist of plant pathogens. **Current Microbiology**, v.16, p.49-53, 1987.

MASCARINI L. Gerbera cultivation in growing media. **Horticultura Internacional**, n. 6, p. 86-88, 1998.

MBILI, N.C.; OPARA, U.L.; LENNOX, C.L.; VRIES, F.A. Citrus and lemongrass essential oils inhibit *Botrytis cinerea* on 'Golden Delicious', 'Pink Lady' and 'Granny Smith' apples. **Journal Plant Disease Protection**, v. 124, p. 499–511, 2017

PASCHOLATI, S. F.; DALIO, R. J. D. Fisiologia do parasitismo: como os patógeno atacam as plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. (Org.). **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres. 5.ed. v.1, 2018. p.390-419.

PERINA, F.J.; ALVES, I.; PEREIRA, R. B.; LUCAS, G. C.; LABORY, C. R. G.; CASTRO, H. A. Óleos essenciais e leite integral no controle do oídio da soja. **Ciência Rural** [online]. vol.43, p.1938-1944. 2013

PESSOA, C.O. **Cálcio e silício via fliar na qualidade de gérbera de corte**.89f. Tese (Doutorado em Agronomia) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

PLETSCH, M. Compostos naturais biologicamente ativos. A aplicação da biotecnologia à produção de compostos naturais biologicamente ativos. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, ano 1, n.4, p.12-15, 1998.

SANTOS, G.R.; BRUM, R.B.C.S.; CASTRO, H. G.; GONÇALVES, C.G.; FIDELIS, R.R. Effect of essential oils of medicinal plants on leaf blotch in Tanzania grass. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 44, p. 587-593, 2013

SANTOS NETO, J.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; TEMPORAL, W.M.; ANDRADE, L.M.; SENNA, J. O. A. Subprodutos de capim-limão no controle de septoriose do tomateiro cultivado em sistema de produção orgânico. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 1, n. 1, mar. 2016. Disponível em: <<http://revistas.aba-agroecologia.org.br/index.php/rbagroecologia/article/view/16202>>. Acesso em: 10 may 2019.

STANGARLIN JR, SCHWAN-ESTRADA KRF CRUZ MES, NOZAKI MH. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, n. 1, p.16-21, 1999.

STANGARLIN, J. R. Uso de extratos e óleos essenciais no controle de doenças de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32 suplemento, p. 94-96, 2007.

SUTTON, J. C.; LI, D-W.; PENG, G.; YU, H.; ZHANG, P.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M. *Gliocladium roseum*: A versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. **Plant Disease**, v. 81, n. 4, p. 316 - 328, 1997.

TECPAR, Instituto de tecnologia do Paraná, Produção de Flores no Estado do Paraná, 2004.

TZARTZAKIS, N. G.; ECONOMAKIS, C. D. Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 8, p. 253-258, 2007.

CAPÍTULO 2

*Standard area diagrams to aid assessment of disease symptoms
caused by *Botrytis cinerea* on *Gerbera jamesonii*

*Redigido de acordo com as normas da revista Plant Disease

Standard area diagrams to aid assessment of disease symptoms caused by *Botrytis cinerea* on *Gerbera jamesonii*

ABSTRACT

The gray mold caused by the fungus *Botrytis cinerea* is among the major diseases in gerbera. The objective of this study was to propose a diagrammatic scale to quantify this disease, due to the need to obtain standardized methods for disease evaluation. Leaves with different levels of severity were collected for determination of the minimum and maximum severity limits, and intermediate levels were determined according to the Weber-Fechner stimulus-response law. The scale was elaborated containing seven levels of severity (0.2, 1.0, 3.0, 11.0, 31.0, and 64.0%). The validation of the scale was performed by 18 experienced and inexperienced evaluators, who estimated with and without the aid of the scale, the severity of 30 leaves with different disease levels. Subsequently, the values of real severity and estimated severity were analyzed by means of linear regression and the estimates compared for accuracy and precision. With the use of the scale, the evaluators presented xx levels of precision and accuracy and the variance of the errors in the quantification of the disease obtained values within the acceptable limits. Thus, the proposed scale proved to be adequate for evaluation of gray mold in gerbera.

Keywords: Disease evaluation, *Gerbera jamesonii*, gray mold.

3.1 INTRODUCTION

Gerbera (*Gerbera jamesonii*), both cut and potted, is among the three most commercialized flowers in Brazil (FERRONATO, 2007). In Paraná, the gerberas are produced in 12 municipalities and represent 76.6% of the Gross Value of Agricultural Production (VBP) concentrated in three municipalities in the North region: Uniflor, Apucarana and Marialva with 41.1%, 23.5% and 12,0% of gross income, respectively (ANDRADE, 2016).

The gerberas are cultivated, to a large extent, in protected environment which provides a favorable place for the occurrence of diseases. Among the diseases is the gray mold caused by the fungus *Botrytis cinerea*. This phytopathogen attacks the leaves and flower buds affecting production and making the product commercially unfeasible. In the leaves, the spots are gray-brown, with variable sizes and shapes, and may or may not exhibit concentric halos and some situations may cause drought and necrosis of leaf tips and edges (TÖFOLI et al, 2011).

Diagrammatic scales have been instrumental in improving accuracy and precision in disease assessments for more accurate results. For foliar diseases, severity is the most commonly used variable, and its evaluation is usually done subjectively through visual analysis. Thus, diagrammatic scales become useful and fundamental tools to assist the evaluator and reduce subjectivity (MESQUINI et al, 2009).

Some aspects should be observed in the elaboration of a diagrammatic scale, such as: a) the upper and lower limits of the scale should correspond, respectively, to the maximum and minimum intensity of the disease observed in the field; b) the symptoms should be as close as possible to those observed in plants; c) at the intermediate levels of disease, the acuity limitations of the human eye defined by the Weber-Fechner stimulus-response law, in which visual acuity is proportional to the logarithm of the stimulus intensity (NUTTER & SCHULTZ, 1995; MESQUINI et al., 2009).

In order to evaluate the severity of fungal diseases in some ornamental plants such as white rust of chrysanthemum (BARBOSA et al., 2006), septoria leaf spot in sunflower (LENS et al, 2009), anthracnose in emperor's bat (BARGUIL et al, 2008) and gray mold in castor bean (SUSSEL; POZZA; CASTRO, 2009). However, to quantify the severity of the gray mold caused by *B. cinerea* in gerbera leaves,

there is no diagrammatic scale elaborated and validated. Thus, this work aimed to elaborate and validate a diagrammatic scale for the quantification of severity in the *Botrytis cinerea* - *Gerbera jamesonii*.

3.2 MATERIAL AND METHODS

3.2.1 Collection of leaves, image analysis and development of SADs

For the elaboration of the diagrammatic scale, 126 leaves of gerbera cultivated in pots and in greenhouse conditions were collected, with different levels of severity and at random. These leaves were photographed with a digital camera (Sony CyberShot 5.1MP). For the photography, the leaves were illuminated using a 40-W light bulb placed 15 cm from the leaf to ensure uniform light conditions. The resulting images were analyzed for diseased area (necrotic) using the image analysis program Quant V1.0.2 (39).

The diseased area in relation to the total surface area of the leaf was used to calculate the percent leaf surface area with symptoms. The minimum and maximum percent severity obtained from the 126 images of the leaves were 0.2 and 64.0%, respectively.

The SAD sets had structure with the six-diagram SAD set. Upper and lower limits were based on the image analysis-measured minimum and maximum disease severity in the sample of 126 leaves. Thus, the severity values illustrated for the six-diagram SAD set were 0.2, 1.0, 3.0, 11.0, 31.0, and 64.0% with symptoms (Fig. 1). The images the six-diagram SAD sets were constructed from images of leaf harvested of gerbera cultivated in pots and in greenhouse conditions. The SAD images were prepared using the image analysis program Quant. V1.0.2. The set were developed to explore whether an additional diagram in the range where most frequent severity was encountered might increase accuracy and reliability, without dramatically increasing the complexity of the SAD set.

3.2.2 Validation of SAD

To validate this SAD set, 18 raters estimated the severity of a subset of 30 images of the leaf with symptoms using a PowerPoint slide presentation, showing each leaf image at random on a computer screen. The raters had a range of experience with disease assessment and familiarity with disease symptoms. Prior to the first assessment, all raters received the same instructions describing the symptoms of the disease and instructions in use of the SAD set. Initially, each rater estimated the severity of leaf disease without the aid of the SAD set. After a 30-min break, each rater reestimated severity of leaf disease on the same fruit images shown at random but with the aid of the six-diagram SAD set as an assessment aid.

3.2.3 Data analysis

The visual estimates without and with SADs were compared to the true values measured by image analysis. Lin's concordance correlation (LCC, Lin, 1989; Nita *et al.*, 2003) analysis was used to evaluate the degree to which the estimates fell on the line of concordance (45° , where slope =1, intercept =0). When there is perfect concordance between the estimates and the true values, then the LCC statistics of systematic bias, $u = 1$, location bias, $\mu = 0$, overall bias or accuracy, $C_b = 1$, precision, $r = 1$, and agreement, $\rho_c = 1$. Deviation from these values indicates bias, loss of precision and loss of agreement. Analyses were performed in Microsoft Excel (Microsoft Inc., Redmond, WA). The difference in each of these statistics when estimates without using SADs and using SADs was calculated for each rater.

The inter-rater reliability was measured using two methods. Firstly, the coefficient of determination (R^2) for each pairwise combination of rater based estimates without or with SADs was calculated. The coefficient of determination reflects the proportion of variation explained by the relationship and indicates how closely one measurement predicts the other. The coefficient of determination was analyzed using SAS V9.4 (SAS Institute, Cary, NC). Secondly, the intra-class correlation coefficient (ICC, ρ) was determined. The ICC compares between-subject and within-subject variance and thus accounts for chance correspondence of the variance between the two measurements. The ICC and its confidence limits were

calculated for the estimates without or with SADs using the Microsoft Excel Add-in “Real Statistics Using Excel[®]”, 2013-2017, freeware provided by Charles Zaiontz (<http://www.real-statistics.com/>).

An equivalence test (Yi *et al.*, 2008; Yadav *et al.*, 2013; Bardsley and Ngugi, 2013) was used to calculate 95% confidence intervals (CIs) for u , μ , C_b , r , ρ_c and R^2 by bootstrapping using the percentile method. With an equivalence test, the null hypothesis is the converse of H_0 , i.e., the null hypothesis is non-equivalence. Thus the difference between the statistics for each rater from each pair of assessments was determined based on a total of 2000 balanced bootstrap samples, and the 95% CIs were calculated. If the resulting CIs span zero there is no significant difference between the means. The equivalence test was performed using SAS V9.4.

Finally, absolute error (the visual estimate made with or without SADs – actual disease severity) was calculated for all estimates.

3.3 RESULTS AND DISCUSSION

3.3.1 Bias, precision and agreement

Each of the raters showed a unique profile when estimating severity without or with SADs (Figure 2). Despite instruction, some raters appeared to use the SADs as a category scale (raters 1, 6, 7 and 8), applying the severity shown in the SADs to the unknowns. All other raters used the scale to interpolate disease severities. Rater 18 was notable in having extremely poor estimates, with or without the use of the SADs. All other raters were more typical in their range of estimates. The difference in the LCC statistics between estimates with and without SADs showed that scale bias, u , was numerically reduced in 55.6% of the 18 raters. Location bias, μ , was numerically reduced in only 38.9% of raters, while the overall measure of bias, C_b , was numerically reduced in 44.4% of the raters. Precision, r , was improved numerically in 66.7% of raters, as was LCC, ρ_c . When using SADs, all measures of agreement were numerically improved for raters 1, 13 and 17, but all measures of agreement declined numerically for raters 6, 9 and 12. Other raters showed reduced bias and/or precision and/or agreement. However, despite these numeric differences, the test of equivalence showed that among the group of raters as a whole, none of

the LCC statistics were significantly improved when using this set of SADs (Table 1), so they did not appear to improve overall agreement or precision, or reduce bias in estimates.

The absolute error suggests that there was at best a very subtle improvement in accuracy (Figure 3A and B). Indeed, the frequency of magnitude in absolute errors was reduced only slightly (Figure 3C). Thus there was a greater frequency of errors in ranges <5% when using SADs, and a lower frequency of errors >20% when compared to estimates of severity without the use of SADs.

3.3.2 Inter-rater reliability

When using SADs, interrater reliability showed an overall reduced frequency of R^2 values <0.61 (Figure 4), and an increase in the frequency of R^2 values >0.61, indicating improved reliability among raters. The mean R^2 increased from 0.578 to 0.667 when using SADs. Indeed, the analysis of equivalence demonstrated that the improvement in the coefficient of determinations was significant among these raters (Table 2). Furthermore, the ICC also showed an improvement when using SADs, increasing from 0.562 to 0.730.

These results indicate that the SAD set developed and validated in this study had little effect improving the ability of most raters to estimate severity of symptoms of *Botrytis cinerea* on leaves of *Gerbera jamesonii*. However, some individual raters did show numeric improvements, although as a sample these SADs did not have as much effect as some previously developed for other plant diseases (REFS).

3.4 REFERENCES

BARBOSA, M. A. G.; MICHEREFF, S. J.; MORA-AGUILERA, G. Elaboração e validação de escala diagramática para avaliação da severidade da ferrugem branca do crisântemo. **Summa Phytopathologica**, vol.32, no.1, p. 57-62. 2006.

BARDSLEY, S.J., AND NGUGI, H.K. Reliability and accuracy of visual methods used to quantify severity of foliar bacterial spot symptoms on peach and nectarine. **Plant Pathology**, 62: 460-474, 2012.

BARGUIL, B.M.; ALBERT, I. C. L.; OLIVEIRA, S. M. A. de. Escala diagramática para avaliação da severidade da antracnose em bastão do imperador. **Ciência Rural**, vol.38, no.3, p. 807-810, 2008.

EVERITT BS. **The Cambridge dictionary of statistics**. pp 360. Cambridge University Press. Cambridge, UK, 1998.

GODOY, C. V., KOGA, L. J. AND CANTERI, M. G. 2006. Diagrammatic scale for assessment of soybean rust severity. **Phytopatologia Brasileira**, 31: 63–68.

JAMES, W.C. An illustrated series of assessment keys for plant diseases, their preparation and usage. **Canadian Plant Disease Survey**, 51: 39–65, 1971.

KRANZ, J. **A study on maximum severity in plant disease**. Travaux de die's a` G. Viennot-Bourgin 16: 9–73, 1977.

LENZ, G.; COSTA, I. D. da ; BALARDIN, R. S.; STEFANELO, M. S.; MARQUES, L. N.; ARRUE, A. Escala diagramática para avaliação de severidade de mancha-de-septoria em girassol. **Ciência Rural**, v.39, n.8, p. 2527-2530. 2009.

LIN, L.I. A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. **Biometrics** 45: 255–68, 1989.

LU, L. AND SHARA, N. Reliability analysis: Calculate and Compare Intra-class Correlation Coefficients (ICC) in SAS. **Statistics and Data Analysis**. NeSug 2007. 3 pp. <http://www.nesug.org/Proceedings/nesug07/sa/sa13.pdf>, 2007.

MESQUINI, R. M.; SCHWAN-ESTRADA, K. R.F.; GODOY, C. V.; VIEIRA, R. A.; ZARATE, N. A.H.; VIEIRA, M. do C. Escala diagramática para a quantificação de *Septoria apiicola* e *Cercospora arracacina* em mandioquinha-salsa. **Tropical Plant Pathology**, vol. 34, 4, 250-255. 2009.

MICHEREFF, S.J., NORONHA, M.A., ANDRADE, D.E.G.T., OLIVEIRA, E.P., XAVIER FILHA, M.S., MOREIRA, P.A.A. Development and validation of a diagrammatic key for *Cercospora* leaf spot of sweet pepper. *Summa Phytopathologica* 32, 260–266, 2006.

NILSSON, H-E. Remote sensing and image analysis in plant pathology. **Annual Review of Phytopathology**, 15, 489-527, 1995.

NITA, M., ELLIS, M. A. AND MADDEN, L. V. Reliability and accuracy of visual estimation of Phomopsis leaf blight of strawberry. **Phytopathology**, 93: 995–1005, 2003.

NUTTER, F.W. JR., GLEASON, M.L., JENCO, J.H., AND CHRISTIANS, N.L. Accuracy, intra-rater repeatability, and inter-rater reliability of disease assessment systems. **Phytopathology**, 83: 806–12, 1993.

NUTTER, F.W. JR., MILLER, D.L. AND WEGULO, S.N. **Do standard diagrams improve the accuracy and precision of disease assessment?** In: 7th International Congress of Plant Pathology, Edinburgh. Volume 2, p.2.1.16, 1998.

NUTTER, F.W. JR., TENG, P.S. AND SHOKES, F.M. Disease assessment terms and concepts. **Plant Disease**, 75:1187-1188, 1991.

Secretaria da Agricultura e do Abastecimento - Departamento de Economia Rural (SEAB-DERAL). 19 p. 2016.

SHERWOOD, R.T., BERG, C.C., HOOVER, M.R. AND ZEIDERS, K.E. Illusions in visual assessment of *Stagonospora* Leaf Spot of orchardgrass. **Phytopathology** 73:173-177, 1983.

SPOLTI, P., SCHNEIDER, L., SANHUEZA, R.M.V., BATZER, J.C., GLEASON, M.L. AND MEDEIROS DEL PONTE, E. Improving sooty blotch and flyspeck severity estimation on apple fruit with the aid of standard area diagrams. **European Journal of Plant Pathology**, 129: 21–9, 2011.

SPÓSITO, M. B., AMORIM, L., BELASQUE, J., JR., BASSANEZI, R. B., & AQUINO, R. Elaboração e validação de escala diagramática para avaliação da severidade da mancha preta em frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, 29: 81–85, 2004.

SUSSEL, A.A.B.; POZZA, E. A.; CASTRO, H. A. Elaboração e validação de escala diagramática para avaliação da severidade do mofo cinzento em mamoneira. **Tropical Plant Pathology**, vol. 34, n. 3, p. 186-191, 2009.

TÖFOLI, J.G.; FERRARI, J.T.; DOMINGUES, R.J.; NOGUEIRA, E.M.C. **Mofo cinzento em plantas oleráceas, frutíferas e ornamentais**. 2011. Artigo em Hypertexto. Disponível em: http://www.infobibos.com/Artigos/2011_2/MofoCinzento/index.htm>. Acesso em: 21/11/2017.

VALE, F. X. R., FERNANDES FILHO, E. I. AND LIBERATO J. R. 2003. **QUANT – A software for plant disease severity assessment**. 8th International Congress of Plant Pathology. Christchurch, New Zealand, 2-7. Pp 105, abstract 8.18.

YADAV, N.V.S., DE VOS, S.M., BOCK, C.H. AND WOOD, B.W. Development and validation of standard area diagrams to aide assessment of pecan scab symptoms on pecan fruit. **Plant Pathology**, 62: 325-335, 2013.

YI Q, WANG PP, HE Y. Reliability analysis for continuous measurements: Equivalence test for agreement. **Statistics in Medicine**, 27: 2816-2815, 2008.

Table 1. Mean concordance statistics (Lin's concordance correlation, LCC - bias, precision and agreement) with bootstrap analysis of the differences between means when estimating severity of symptoms of *Botrytis cinerea* on images of 30 diseased leaves of *Gerbera jamesonii* without or with a standard area diagram (SAD) set.

LCC statistic	Mean		Mean diff ^a	95% CIs ^b (upper and lower)
	No SAD	SAD set		
u^c	0.948	0.926	0.048	-0.033 to 0.158 ^h
μ^d	-0.264	-0.370	0.096	-0.117 to 0.389
C_b^e	0.856	0.891	0.037	-0.034 to 0.134
r^f	0.825	0.857	0.032	-0.006 to 0.080
ρ_c^g	0.736	0.787	0.053	-0.015 to 0.143

^aMean of the difference between each rating.

^bConfidence intervals (CIs) were based on 2000 bootstrap samples. If the CIs embrace zero, the difference is not significant ($\alpha = 0.05$).

^cScale bias, or slope shift (u , 1 = no bias relative to the concordance line).

^dLocation bias, or height shift (μ , 0 = no bias relative to the concordance line).

^eOverall bias (C_b) measures how far the best-fit line deviates from the line of concordance.

^fThe correlation coefficient (r) measures precision.

^gLin's Concordance Correlation Coefficient (ρ_c) combines both measures of precision (r) and accuracy (C_b) to measure the degree of agreement with the true value.

^hBold text indicates a significant difference.

Table 2. The inter-rater reliability of the estimates of of severity of symptoms of *Botrytis cinerea* on leaves of *Gerbera jamesonii* made by 18 raters of 30 images of diseased leaves either without or with use of a standard area diagram sets (SADs) as an aid for assessment. Inter-rater reliability was measured using either the coefficient of determination (R^2)^a or the the intra-correlation coefficient (ρ)^b.

Statistic	Variable	Value	95% CIs	Mean diff ^c
Coefficient of determination (R^2)	No SADs	0.578	0.060 to 0.116^d	0.089
	SADs	0.667		
Intra-class correlation coefficient (ICC, ρ)	No SADs	0.562	0.415 to 0.717 ^e	0.168
	SADs	0.730	0.617 to 0.835	

^aThe coefficient of determination (R^2) is the proportion of the variation explained by the association between two sets of measurements.

^bThe ICC (ρ) compares the between-subject variance with the within-subject variance and is the relative amount of variation from the combined mean of the two test sessions explained by differences between the subjects.

^cMean of the difference between each rating (i.e., without and with SADs).

^dConfidence intervals (CIs) for the coefficient of determination were based on 2000 bootstrap samples. If the CIs embrace zero, the difference is not significant ($\alpha=0.05$). Bold text indicates a significant difference.

^eConfidence intervals (CIs) for the intraclass correlation coefficient for each mean were calculated with Real Statistics Using Excel[®], 2013-2017, freeware provided by Charles Zaiontz: <http://www.real-statistics.com/>.

Figure 1. Standard area diagrams developed as an aid for assessment of disease caused by *Botrytis cinerea* on leaves of *Gerbera jamesonii*.

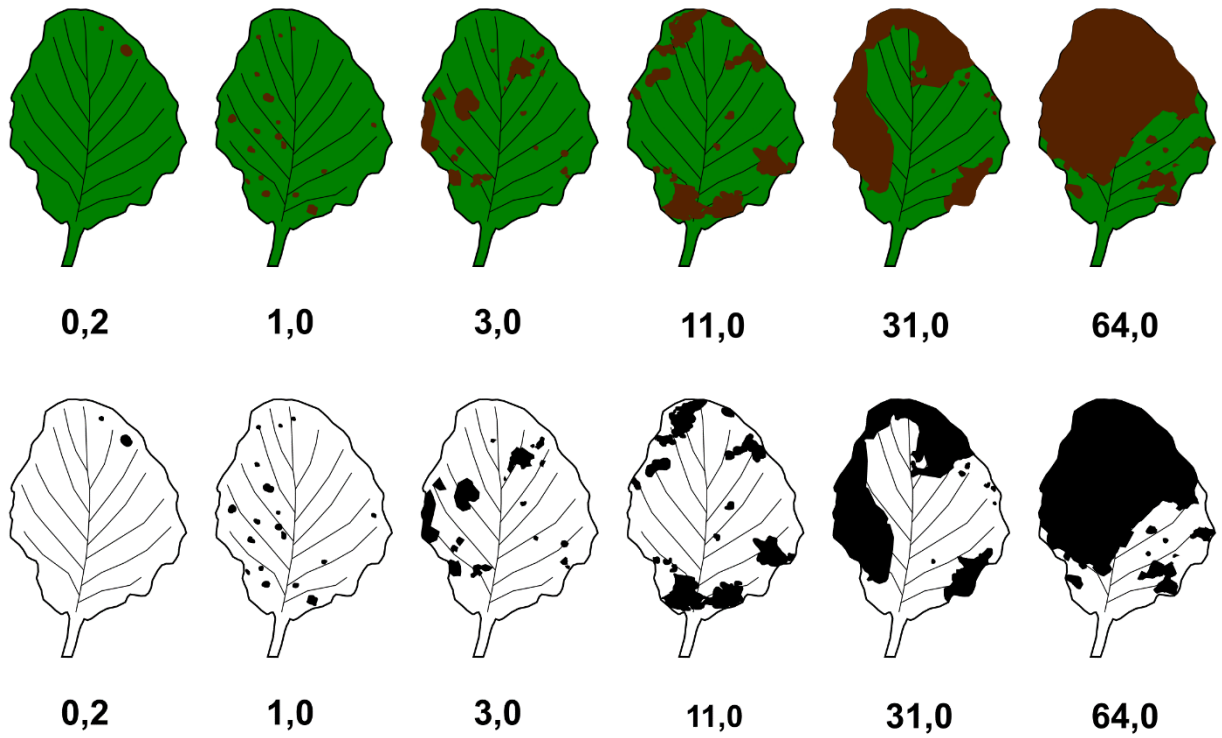


Figure 2. Estimates of severity of symptoms of *Botrytis cinerea* on images of 30 leaves of *Gerbera jamesonii* assessed by eighteen raters without use of standard area diagram sets (SADs) as assessment aides or using a SADs. The difference in scale bias (ν), location bias (μ), accuracy or overall bias (C_b), correlation coefficient (r) and Lin's concordance correlation coefficient (ρ_c) when using SADs or when not using SADs are indicated. Positive values indicate a gain, and negative values a loss in any particular statistic for that rater.

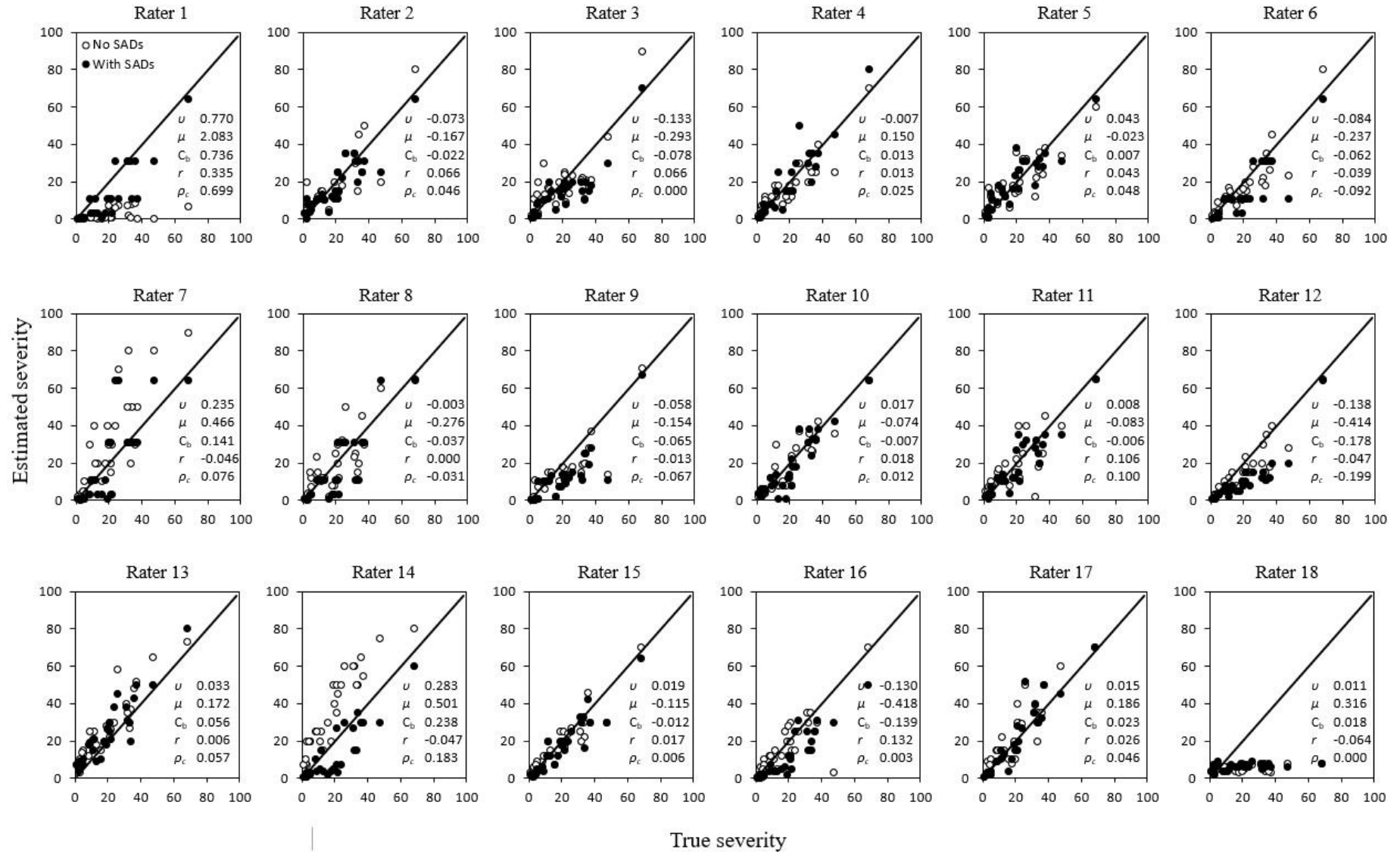


Figure 3. The absolute error (estimate minus true disease) of estimates of severity of symptoms of *Botrytis cinerea* on 30 images of leaves of *Gerbera jamesoni* by eighteen raters without use of standard area diagram sets (SADs) as assessment aides (**A**), or using a SADs (**B**), and the frequency of absolute error from zero without and with SADs (**C**).

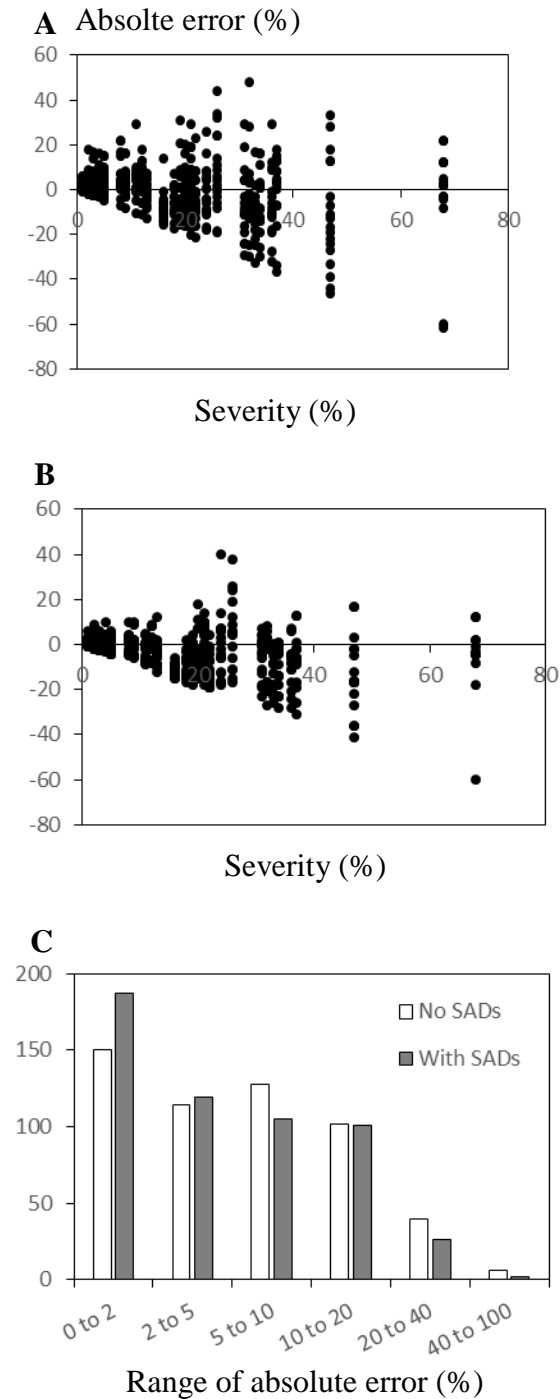


Figure 4. The frequency of the inter-rater reliability of eighteen raters measured by the coefficient of determination (R^2) without and with use of a standard area diagram set (SAD) as an aid for assessment of thirty images of symptoms of *Botrytis cinerea* on leaves of *Gerbera jamesonii* by 18 raters.

