



LUANA PIERMANN

**CONTROLE DO MOFO CINZENTO DA
BEGÔNIA COM *Bacillus* spp., ÓLEO DE CAFÉ E
SAIS**

**LAVRAS – MG
2021**

LUANA PIERMANN

**CONTROLE DO MOFO CINZENTO DA BEGÔNIA COM *Bacillus* spp.,
ÓLEO DE CAFÉ E SAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Controle Biológico, para a obtenção do título de Mestre.

Dr. Wagner Bettiol
Orientador

**LAVRAS – MG
2021**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Piermann, Luana.

Controle do mofo cinzento da begônia com *Bacillus* spp., óleo de
café e sais / Luana Piermann. - 2014.

68 p. : il.

Orientador: Wagner Bettiol.

Dissertação (Mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2014.

Bibliografia.

1. Controle biológico. 2. Controle alternativo. 3. *Botrytis cinerea*.

I. Bettiol, Wagner. II. Título.

LUANA PIERMANN

**CONTROLE DO MOFO CINZENTO DA BEGÔNIA COM *Bacillus* spp.,
ÓLEO DE CAFÉ E SAIS**

**CONTROL OF THE BEGONIA GREY MOLD WITH *Bacillus* spp.,
COFFEE OIL AND SALTS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em controle Biológico, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 26 de fevereiro de 2014.

Prof. Dr. Eduardo Alves

UFLA

Dr. Marcelo Augusto Boechat Morandi

EMBRAPA

Prof. Dr. Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros

UFLA

Dr. Wagner Bettiol
Orientador

**LAVRAS – MG
2021**

Aos maiores incentivadores de todas as minhas conquistas, meus pais: Marcos
João Piermann e Leny R. Piermann (*in memoriam*).

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A meus pais, Marcos João Piermann e Leny R. Piermann (*in memoriam*), ao meu irmão Felipe Piermann e à minha avó Laura Bezerra de Lacerda.

Às minhas tias Claudia e Paula.

Ao amigo e confidente Hudi.

À UFLA, pela oportunidade de realização do curso.

À Embrapa Meio Ambiente, por ceder a estrutura e materiais para a condução dos ensaios.

Ao Dr. Wagner Bettiol, pela orientação e confiança na realização deste trabalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa de auxílio aos estudos.

Ao Abrahão, pela amizade.

À Fumiko, pela amizade.

À Ursula, pelos momentos de ensino, apoio e compreensão.

Ao Edson, pela amizade e ajuda.

Ao amigo Carlos Eduardo que realizou minha inscrição no mestrado sem a qual nada disso seria possível.

Aos amigos de curso e trabalho: Larissa, Dayana, Ana Karla, Zayame, Michelle, Regiane, Lúcio, Daniel, Cassiano, Dalton e André.

Aos companheiros de república: Bruna, Bianca, Carol, Letícia e Iago.

Ao meu orientador, Wagner Bettiol, pelo apoio e paciência.

Às técnicas do LMA da Embrapa Meio Ambiente: Anamaria, Elke, Rosely e Márcia, pela ajuda e colaboração neste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

“Everybody is a genius. But, if you judge a fish by its ability to climb a tree, it will live its whole life believing that it is a stupid”

Albert Einstein

RESUMO

O mofo cinzento causa prejuízos econômicos na maioria das flores cultivadas em ambiente protegido, dentre elas a Begônia. O controle químico com tiofanato metílico e clorotalonil ainda é o mais utilizado. Devido aos problemas causados pelo uso exclusivo do controle químico é necessário que novos métodos de controle sejam desenvolvidos. Assim, os agentes de biocontrole, os produtos de origem vegetal e os sais conservadores de alimentos, inócuos à saúde humana, são alternativas para o manejo da doença. O presente trabalho objetivou avaliar a eficiência dos óleos de café obtidos de grãos torrados e crus nas concentrações de 0, 1, 10, 100, 1.000 e 10.000 ppm; dos produtos comerciais *Bacillus subtilis* QST-713, *Bacillus pumilus* QST-2808 nas concentrações 0, 10^7 , 10^8 e 10^9 UFC/ml; *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*, comercializados como probióticos, nas concentrações 0, 10^6 , 10^7 e 10^8 UFC/ml; e dos sais Bicarbonato de Sódio, Carbonato de Sódio, Bicarbonato de Potássio e Carbonato de Potássio nas concentrações de 0, 1, 10, 100, 1.000 e 10.000 ppm no controle do mofo cinzento. Todos os produtos, nas maiores concentrações, inibiram o crescimento micelial, a germinação dos conídios de *B. cinerea* e a colonização de discos de folhas de begônia pelo patógeno.

Palavras-chave: Controle biológico. Controle alternativo. *Botrytis cinerea*.

ABSTRACT

The grey mold can cause economic damage to most flowers cultivated in greenhouses, among which is the Begonia. Chemical control with methyl thiophanate and chlorothalonil is still mostly used. Due to issues caused by the excessive use of chemical control, it is necessary that new control methods be developed. Therefore, biocontrol agents, vegetable oils and food-conserving salts, innocuous to human health, are alternatives to disease management. The present work aimed at evaluating the efficacy of coffee oils obtained from roasted and raw coffee grain, in the concentration of 0; 1; 10; 100; 1,000 e 10,000 ppm; of the *Bacillus subtilis* QST-713 and *Bacillus pumilus* QST-2808 commercial products, in the concentrations of 0, 10^7 , 10^8 e 10^9 UFC/ml; of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*, commercial probiotics, in the concentrations of 0, 10^7 , 10^8 and 10^9 UFC/ml; and of salts sodium bicarbonate, sodium carbonate, potassium bicarbonate and potassium carbonate, in the concentrations of 0; 1; 10; 100; 1,000 and 10,000 ppm. All products, in their highest concentrations, inhibited mycelial growth, *B. cinerea* conidia germination and leaf disk colonization of begonia leaves.

Keywords: Biological control. Alternate control. *Botrytis cinerea*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	A begônia e suas doenças	13
2.2	<i>Botrytis cinerea</i>	15
2.3	Controle biológico e alternativo	17
2.4	<i>Bacillus spp.</i>	18
2.5	Sais inorgânicos	20
2.6	Óleos de café	21
3	MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1	Instalações dos ensaios	25
3.2	Procedimentos para obtenção e estudo do isolado de <i>Botrytis cinerea</i>	25
3.3	Produtos e concentrações testadas para controle do patógeno	30
3.4	Inibição do crescimento micelial de <i>B. cinerea</i>	30
3.5	Inibição da germinação de conídios de <i>B. cinerea</i>	31
3.6	Inibição da colonização de disco de folha	31
3.7	Análise estatística	33
4	RESULTADOS	35
4.1	Inibição do crescimento micelial de <i>Botrytis cinerea</i>	35
4.2	Inibição da germinação de conídios de <i>Botrytis cinerea</i>	37
4.3	Inibição da colonização de <i>B. cinerea</i> em discos de folhas de begônia	41
5	DISCUSSÃO	51
6	CONCLUSÕES	57
	REFERÊNCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

A floricultura no Brasil passou a desempenhar um papel importante, a partir de 1969, com a inauguração do Mercado de Flores na Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP), fornecendo flores e plantas ornamentais produzidas por pequenos grupos organizados de origem alemã, holandesa e japonesa entre outros. Em 1972, foi fundada a Cooperativa de Produtores de Holambra-SP que, ao alcançar excelente qualidade e elevada quantidade de produtos, passou a necessitar de um sistema eficiente de vendas, em larga escala, que possibilitasse o escoamento da produção impulsionada pelo emprego de recursos tecnológicos, foi criado, portanto, o Veiling, em 1991 (REETZ et al., 2007; SILVEIRA, 2013).

A floricultura nacional vem se desenvolvendo nos últimos anos, caracterizando-se como segmento promissor da horticultura intensiva. A atividade é favorecida pela diversidade de climas, solos, potencial exportador e pela geração de empregos diretos e indiretos (ANEFALOS; GUILHOTO, 2003). O consumo brasileiro *per capita* de flores gira em torno de US\$7,00/ano, enquanto em países desenvolvidos como, por exemplo, a Suíça, esse valor chega a US\$170,00/ano. O Brasil possui 28 centros atacadistas, abastecidos por, aproximadamente, quatro mil produtores, numa área cultivada, aproximadamente, de seis mil hectares, gerando cerca de 120 mil empregos diretos (REETZ et al., 2007).

Em 2007, a movimentação foi, em torno, de US\$1,3 bilhão, o qual é mantido, basicamente, pela comercialização interna. As exportações aumentaram gradativamente ao longo da última década alcançando, para o mesmo período, cifras na ordem de US\$35 milhões. Os valores de exportação passaram a sofrer deflação, a partir de 2008, como consequência da crise

imobiliária dos Estados Unidos e da crise Europeia, abalando os principais países exportadores (JUNQUEIRA; PEETZ, 2008, 2010).

Dentre as principais regiões produtoras de flores no Brasil destaca-se a Sudeste, o estado de São Paulo é responsável por 70% da produção total. As principais flores produzidas em vasos no país são: crisântemo, violeta, kalanchôe, begônia, azaleia, orquídea e bromélia (JUNQUEIRA; PEETZ, 2005; REETZ et al., 2007).

No mercado brasileiro, as flores comercializadas estão assim distribuídas: 50% em vasos, 40% de corte e 10% de plantas ornamentais (REETZ et al., 2007). Segundo o Instituto Brasileiro de Floricultura (IBRAFLOR), no mês de dezembro de 2012, as vendas de Begônia corresponderam a 7,1% dos produtos comercializados na categoria “flores em vaso” no Veiling, em Holambra-SP.

O controle das doenças das plantas ornamentais no país é realizado por meio da aplicação de pesticidas, porém, o número de produtos registrados para a floricultura é pequeno (JUNQUEIRA; PEETS, 2005). Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2013), para o controle do mofo cinzento na cultura da Begônia, apenas tiofanato metílico e clorotalonil são registrados. Apesar da utilização de agrotóxicos para alcançar os padrões exigidos para a comercialização das flores, a ANVISA não possui um programa de análise de resíduos específico para esse setor da horticultura (FONSECA et al., 2007).

O mercado está mais exigente, aumentando a demanda por produtos de melhor qualidade. Dessa forma, novas tecnologias são necessárias para que o manejo fitossanitário seja feito de maneira menos agressiva ao homem e ao ambiente (DAYAN; CANTRELL; DUKE, 2009).

Visando à redução do uso de agrotóxicos e devido ao seu custo elevado, o manejo integrado de pragas e doenças vem ganhando destaque entre os produtores de flores. O controle baseado na utilização de agentes de biocontrole

e produtos naturais que possuam potencial para serem empregados na horticultura tem se destacado.

O estudo realizado teve como objetivo avaliar a eficiência de *Bacillus* spp., óleos de café e sais no controle do mofo cinzento da Begônia.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A begônia e suas doenças

A maior parte das espécies de Begônia tem origem andina, apresentando fácil propagação vegetativa (DAUGHTREY; WICK; PETERSON, 1995). O gênero é muito apreciado, e possui relevância econômica tanto para o comércio de flores quanto de folhagens. As cultivares de *Begonia elatior* são provenientes do cruzamento de *Begonia socotrana* Hook. x *Begonia tuberhybrida* Voss, e estão entre os 10 gêneros de flores mais comercializados na Europa Ocidental (REYNOLDS; DEVRIES; CARNEY, 1998). A família Begoniácea possui representantes nativas encontradas nas regiões tropicais da África, Américas e Ásia (LARSON, 1980; KARLSSON; HEINS, 1992). O gênero apresenta cerca de 1.400 espécies (LANGE; BOUMAN, 1999). No Brasil, a aceitação é decorrente da variedade de cores e longevidade das inflorescências (LARSON, 1980; REYNOLDS; DEVRIES; CARNEY, 1998).

As Begônias possuem tamanhos variados, crescem em diferentes habitats e apresentam ampla diversidade morfológica. As flores femininas e as masculinas encontram-se na mesma planta, porém separadas. A flor feminina apresenta características marcantes como ovário inferior trilobado, encontrando-se normalmente agrupadas, as brácteas situam-se na base da flor ou no caule, as folhas são alternadas, obliquamente ovais com duas estípulas na base (BRILMAYER, 1963).

As raízes podem ser utilizadas para classificação, são: fibrosas, rizomatosas ou tuberosas (MEJIAS; RUANO, 1990; SEABROOK; ROCHFORD, 1974). De acordo com Brilmayer (1963), as primeiras espécies foram encontradas em Santo Domingo, em 1690, e recebeu esse nome em homenagem a Michel Begon, nome dado por Charles Plumier.

Durante o cultivo da Begônia, é comum a ocorrência de doenças causadas por diversos fitopatógenos como fungos, bactérias, vírus e nematoides exigindo um manejo adequado e eficiente, evitando, assim, a depreciação do produto e o prejuízo econômico (ALEXANDRE; DUARTE, 2007). Dentre as principais doenças destacam-se: alternariose (*Alternaria* sp.), antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*), cercosporiose (*Cercospora begoniae*), fusariose (*Fusarium* spp.), mancha bacteriana (*Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae*), mancha de mirotécio (*Myrothecium roridum*), oídio (*Oidium begoniae*), podridões de haste e de folha (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*) e o mofo cinzento (*Botrytis cinerea*) (ALEXANDRE; DUARTE, 2007; DAUGHTREY; WICK; PETERSON, 1995; FUJINAWA et al., 2012; SCHROERS et al., 2004). Essas doenças são limitantes à produção afetando a qualidade e a durabilidade das plantas. O mofo cinzento é uma das doenças mais disseminadas mundialmente (AGRIOS, 2005).

O patógeno *B. cinerea* se desenvolve em restos culturais e superfície do solo, essa é a principal fonte de inóculo (AGRIOS, 2005). O manejo da doença é realizado por meio da inspeção da produção e da remoção e descarte de folhas, flores e vasos infectados dentro da casa de vegetação. Não são recomendados sistemas de irrigação como aspersão ou nebulização, pois tornam as condições favoráveis ao desenvolvimento da doença, elevando a umidade relativa e o período de molhamento foliar. Para promover uma rápida secagem das folhas é necessário aumentar o espaçamento entre os vasos favorecendo a circulação do ar (JARVIS, 1989; LOPEZ-HERRERA; VERDÚ-VALIENTE; MELERO-VARA, 1994).

Estudos realizados utilizando-se produtos alternativos/biológicos têm demonstrado potencial de controle em campo e em casa de vegetação do mofo cinzento. Por vezes, com resultados melhores do que os obtidos pelos fungicidas recomendados, logo, demonstram ser uma alternativa viável para o controle de

B. cinerea (ELAD; MALATHRAKIS; DIK, 1996; MORANDI et al., 2003; SUTTON et al., 1997).

2.2 *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea Pers.: Fr., agente causal do mofo cinzento, possui como teleomorfo o ascomiceto *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel, pertence à família Sclerotiniaceae (Discomicetes inoperculados), sendo considerado um fungo necrotrófico, ubíquo, cosmopolita e polífago. Possui capacidade de infectar uma ampla gama de plantas hospedeiras, lesionando as partes aéreas, raízes, bulbos, sementes e materiais propagativos, havendo relatos de mais de 200 gêneros de plantas atacados (JARVIS, 1989; MAUDE, 1980). Tal doença é considerada uma das mais destrutivas, afetando culturas como roseira, crisântemo e begônias, entre outras, quando produzidas em larga escala e em ambiente protegido (AGRIOS, 2005; DAUGHTREY; WICK; PETERSON, 1995; GULLINO; ALOI; GARIBALDI, 1989).

O mofo cinzento afeta principalmente as flores, podendo causar manchas foliares, apodrecimento de brotos, tombamento de mudas, cancos no caule, pecíolo, hastes e, eventualmente, raízes (AGRIOS, 2005). Os sintomas são comumente caracterizados pela descoloração dos tecidos que adquirem aspecto úmido e se tornam necróticos, é frequente a observação de crescimento cotonoso acinzentado decorrente da formação de conídios e conidióforos (AGRIOS, 2005; BEEVER; WEEDS, 1980).

O nome *Botrytis cinerea* descreve, com exatidão, características morfológicas facilmente visíveis ao microscópio, traduzido como “uvas cinzas”, o termo “uvas” refere-se à disposição dos conídios no conidióforo que conforme se desenvolvem adquirem coloração acinzentada (LIDDEL et al., 1940). Uma das principais bases para a delimitação do gênero é a ontogenia do anamorfo.

Dentre as fases encontradas no seu ciclo de vida, a mais importante é a somática, constituída pelo micélio o qual produz conídios, microconídios e escleródios. A estrutura de resistência, sob condições adequadas, pode germinar produzindo apotécio, na qual serão encontrados ascos e ascósporos, porém normalmente o que se observa é a germinação originando micélio e conídios (BEEVER; WEEDS, 1980).

O mofo cinzento pode se desenvolver e completar seu ciclo também em tecidos senescentes, ou seja, em restos culturais, caracterizando-se, assim, como necrotrófico (AGRIOS, 2005).

A produção de conídios ocorre, preferencialmente, entre 12-20 °C, havendo necessidade de alta umidade relativa, maior que 90%. A liberação dos conídios depende de um mecanismo higroscópico que ocorre quando há uma rápida mudança na umidade relativa, que ocorre, normalmente, nas horas mais quentes do dia. A germinação dos conídios é favorecida por temperaturas amenas, 20 °C. Entretanto, o tubo germinativo se desenvolve melhor a 30 °C (JARVIS, 1989). A infecção pode ocorrer diretamente ou por meio de ferimentos decorrentes dos tratamentos culturais.

Botrytis cinerea apresenta uma grande variação genotípica e fenotípica que, quando associada à sua elevada capacidade de produção de conídios, de infecção (praticamente todos os estádios de desenvolvimento da planta) e ampla gama de hospedeiros, provoca epidemias severas de rápido progresso (GULLINO, 1992). Tais epidemias são agravadas pela pressão de seleção decorrente de fatores xenobióticos como consequência dos intervalos das aplicações cada vez menores e concentrações cada vez maiores do ingrediente ativo, assim como pelas diferentes misturas que têm se tornando corriqueiras (BARDAS; MYRESIOTIS; KARAOGLANIDIS, 2008; ELAD et al., 2004; GHINI; KIMATI, 2002; GULLINO, 1992; GULLINO; ALOI; GARIBALDI, 1989; TIMUDO-TORREVILLA et al., 2005; YOON et al., 2008).

Benzimidazóis e dicarboximidas são exemplos de fungicidas empregados no controle do mofo cinzento, normalmente registrados para outras culturas. Visando a diminuir a possibilidade do aparecimento de novas estirpes resistentes recomenda-se o emprego de produtos com distintos mecanismos de ação (YOON et al., 2008).

O mofo cinzento apresenta diferentes mecanismos de ataque, infectando uma ampla gama de hospedeiros que servem como fonte de inóculo, sobrevivendo na forma de micélio, conídios e, ainda, por longos períodos como escleródios em restos culturais. Por esses motivos, quando apenas uma medida de controle é aplicada, os resultados não são satisfatórios, principalmente em longo prazo (WILLIAMSON et al., 2007).

2.3 Controle biológico e alternativo

Segundo Baker e Cook (1974), controle biológico é “a redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença, provocada por um patógeno ou parasita, nos seus estados de atividade ou dormência, por um ou mais organismos, realizado naturalmente ou pela manipulação do ambiente, hospedeiro ou antagonista, ou pela introdução em massa de um ou mais antagonistas”, ou seja, a priori, objetiva-se diminuir a quantidade de inóculo inicial infectando a planta, após o patógeno estabelecer-se o foco se torna impedir que possa causar doenças e perdas por meio da alteração do ambiente ou da microbiota. Dessa forma, o uso de agentes de controle biológico deve ser sempre associado ao manejo integrado, visando ao favorecimento do antagonista, seu estabelecimento e/ou a resposta da planta.

Os agentes de biocontrole podem atuar por vários mecanismos como: antibiose, parasitismo, competição, hipovirulência, predação e indução de defesa do hospedeiro (BETTIOL; GHINI, 1995). O controle biológico de patógenos do

filoplano necessita da introdução e do estabelecimento do antagonista competindo pelos sítios de infecção antes da sua instalação, inibindo, dessa maneira, a disseminação da doença (FOKKEMA, 1993).

No início dos anos 70, paralelamente ao desenvolvimento do conceito de manejo integrado de pragas e doenças (MIP), teve início um movimento de oposição em relação ao padrão produtivo agrícola convencional, baseado num amplo conjunto de propostas alternativas, o qual ficou conhecido como “Agricultura alternativa”. Tal movimento preconiza a utilização de diferentes estratégias de controle, as medidas recomendadas são capazes de atuar na redução da doença, causando decréscimo na taxa do seu desenvolvimento durante o desenvolvimento da cultura (PAULA JUNIOR et al., 2005).

O controle alternativo busca técnicas ecologicamente adequadas, enfatizando aspectos conservacionistas, convivendo com o patógeno e minimizando seus efeitos mediante medidas não poluentes como rotação de cultura, o uso de caldas, extratos vegetais, agentes de controle biológico e matéria orgânica compostada e fermentada (PAULA JUNIOR et al., 2005; SANTOS; MENDONÇA, 2001). Segundo Bettiol (1991), nesse conceito são incluídos o controle biológico e a indução de resistência em plantas (excetuando-se o controle químico e o melhoramento genético). De acordo com Romeiro (2005), é necessário encontrar a forma mais inócua possível de ativar os mecanismos de defesa da planta, promovendo sua própria proteção contra patógenos ao invés de saturá-la e intoxicá-la pelo uso de agrotóxicos.

2.4 *Bacillus spp.*

Bactérias são agentes de controle biológico de fácil manipulação, de rápida geração e colonizadores agressivos. O gênero *Bacillus* é capaz de crescer em uma ampla faixa de temperatura e sobreviver em condições adversas, são

formadores de endósporos possibilitando, assim, uma maior vantagem competitiva em relação à sua sobrevivência e, também, em relação à vida de prateleira quando em formulações comerciais (EMMERT; HANDELSMAN, 1999; WARRIOR; KONDURU; VASUDEVAN, 2002).

As bactérias desse gênero são Gram-positivas e caracterizam-se pela forma de bastonetes móveis, dotados de flagelos polares ou peritríqueos, são resistentes ao calor, 80 °C, o que permite selecioná-los de maneira a excluir outros microrganismos não termotolerantes. São capazes de produzir cerca de 167 diferentes antibióticos, de amplo espectro, principalmente polipeptídeos, são eficazes contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos (EMMERT; HANDELSMAN, 1999; KATZ; DEMAINE, 1977).

Bacillus pode ser encontrado em diferentes ambientes, desde água do mar, solo e locais extremos como fontes termais (PERO; SLOMA, 1993). *Bacillus subtilis* são considerados não patogênicos e, segundo a US Food and Drug Administration (USFDA), classificados como “generally regarded as safe”. Possuem, ainda, como importante característica a capacidade de produzir esporos que são estruturas extremamente resistentes a temperaturas elevadas, pH desfavorável, falta de nutrientes, falta de água (HARWOOD; WIPAT, 1996; PIGGOT; HILBERT, 2004). As culturas bacterianas são facilmente convertidas em formulações em pó sem o decréscimo da viabilidade apresentada por outros gêneros de bactérias (LOLLOO et al., 2010).

Segundo Thakore (2006), a maioria dos biopesticidas utilizados para suprimir a população de patógenos são organismos vivos ou produtos derivados desses microrganismos, demonstrando vantagens quando comparados aos tratamentos convencionais como decomposição mais rápida e menor agressividade contra organismos não alvos. Bactérias utilizadas como agentes de biocontrole são isoladas de ambientes supressivos. Estas são comumente

encontradas na parte aérea ou no solo em locais de elevada infestação em plantas aparentemente saudáveis (COOK; BAKER, 1983).

Os ambientes aeróbios são os mais favoráveis à proliferação do *Bacillus*. Entretanto, são capazes de sobreviver e crescer em ambientes anaeróbios facultativos, o que se torna uma grande vantagem, quando introduzidos no solo; por ser móvel, apresenta facilidade para a colonização de nichos específicos na rizosfera (NAKKANO; HULETT, 1997). O grande interesse despertado em relação ao gênero é devido à diversidade dos mecanismos de ação.

2.5 Sais inorgânicos

Sais, como bicarbonatos, têm sido empregados na indústria como aditivo alimentar visando à regulação do pH e ao controle da deterioração por apresentarem propriedades antimicrobianas sem possuir restrições quanto a sua utilização, são inócuos para o homem e animais. Têm demonstrado controlar eficazmente patógenos de plantas (CORRAL; POST; MONTVILLE, 1988; MONTEVILLE; SHIH, 1991).

De acordo com Mazzini (2002), sais são utilizados sem restrições na Europa e na América do Norte, e são permitidos, inclusive, para a certificação de produtos orgânicos. Suas aplicações são consideradas seguras pela US Food and Drug Administration, assim como pelo United State Department of Agriculture (SMILANICK et al., 1999).

Segundo Bettioli, Ghini e Morandi (2005), o bicarbonato de sódio tem sido efetivo no controle de oídio nas culturas de pepino e abobrinha, não sofrendo alterações quando aplicado concomitantemente com óleos. Smilanick et al. (1999) observaram a capacidade fungistática de diferentes sais como carbonato de sódio e potássio, entre outros sobre a germinação de esporos de *Penicillium*. Franco e Bettioli (2002) avaliaram a inibição da germinação de

conídios de *Penicillium digitatum*, pelo método do flavedo, por bicarbonato de sódio 3%, carbonato de sódio 1% e tiabendazole 0,15%. Os autores verificaram as inibições de 81, 95 e 96%, respectivamente. Para outros produtos testados à base de potássio, houve inibição de 100% na concentração de 1% demonstrando, portanto, o potencial de controle do fitopatógeno.

Fallanj et al. (2013) observaram a redução da incidência de *Penicillium* pós-colheita em laranjas por meio da utilização de sais como carbonato de sódio, sulfato de sódio, cloreto de sódio, entre outros. Quando aplicados em água proveniente de torneira na concentração de 1,35%, todos os sais utilizados, exceto o bicarbonato de sódio, foram capazes de reduzir entre 5-73% a germinação de conídios. Entretanto, os resultados para os mesmos sais com água eletrolisada variaram entre 33-90% de redução. Logo, independentemente de a água estar eletrolisada ou não, os sais reduziram de forma significativa a germinação dos conídios de *Penicillium*, quando inoculado em fermentos nos frutos. Entretanto, o bicarbonato de sódio, normalmente, é aplicado na concentração de 2-3%, a utilizada por Fallanj et al. (2013) foi menor, logo, o resultado não foi tão eficiente quanto o dos outros sais.

2.6 Óleos de café

Os óleos fixos são misturas de substâncias lipídicas, normalmente extraídos de sementes, diferenciam-se dos essenciais por serem pouco estáveis em presença de luz, calor e ar, por apresentarem sabor ácido e picante, ausência de coloração ou serem levemente amarelados, além de pouco solúveis em água (SAITO; SCRAMIN, 2000; SIMÕES; SPITZER, 1999).

Utilizando óleos fixos, Dorighello (2013) observou a eficiência dos óleos de café torrado e cru nas concentrações de 1 e 2% em reduzir *in vitro* a germinação de uredósporos de *Phakopsora pachyrhizi* e a severidade da

ferrugem em folhas destacadas de soja. A redução da severidade também foi observada em casa de vegetação e campo.

Os produtos de origem vegetal têm demonstrado potencial antimicrobiano. Resultados animadores levam a vislumbrar sua aplicabilidade na agricultura de forma eficiente (MATTOS, 2010; MEDICE, 2011; PEREIRA et al., 2008). Sua eficiência no controle de doenças de plantas é devido à ação fungitóxica, capacidade de inibição do crescimento micelial e da germinação de conídios, além de outros mecanismos.

Pereira et al. (2008) demonstraram o efeito de diferentes concentrações do extrato aquoso de casca de café, obtido a partir de 100 g de pericarpo seco, moído, ressuspenso e extraído a quente em refluxo, sobre a germinação de conídios, índice de crescimento micelial e desenvolvimento *in vivo* de *Cercospora coffeicola*. O extrato alterou a germinação dos conídios e o crescimento dos tubos germinativos. Entretanto, inibiu o crescimento micelial proporcionalmente ao aumento da concentração e aumentou os picos de peroxidase das mudas tratadas, durante as avaliações realizadas nos 2º e 9º dias.

Mattos (2010) conduziu ensaios sobre a utilização de óleos de café no controle do *Penicillium digitatum* e *Guignardia citicarpa* e a aceitação de consumidores, por meio de análises sensoriais. A autora verificou que, praticamente, todos os consumidores não gostaram do aroma das laranjas tratadas com os óleos. Entretanto, não detectaram alterações no sabor. Tais características não oferecem contratempo para a utilização de óleo de café na floricultura, pois a Begônia é comercializada com base em características visuais.

Médice et al. (2007) observaram redução na severidade da ferrugem da soja, causada por *Phakopsora phakyrhizi* de 35 a 62% em plantas tratadas com óleos essenciais de eucalipto citriodora, tomilho, citronela e nim, sete dias antes da inoculação do patógeno. Verificou-se a inibição da germinação e o

“murchamento” dos esporos. Zambonelli et al. (1996), ao testarem o efeito do óleo essencial de tomilho, observaram a degeneração de hifas e o extravasamento celular de *Colletotrichum lindemuthianum* e *Pythium ultimum*.

Carvalho, Cunha e Silva (2012), avaliaram o efeito de extrato aquoso de casca de café, 3%, e do extrato alcóolico de tomilho, 2%, e de sais sobre a ferrugem e a cercosporiose do cafeeiro. Foi observado que nenhum dos tratamentos teve efeito sobre os patógenos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Instalações dos ensaios

Os ensaios foram realizados nas instalações pertencentes ao Laboratório de Microbiologia Ambiental (LMA) da Embrapa Meio Ambiente, situado em Jaguariúna-SP, no período de Agosto de 2012 a Julho de 2013.

3.2 Procedimentos para obtenção e estudo do isolado de *Botrytis cinerea*

O material vegetal foi coletado no sítio Panorama Flores, situado em Holambra-SP (Latitude 22° 04'13'', longitude 47° 04'13''). Os isolados de *B. cinerea* foram obtidos a partir de flores e folhas de *Begonia elatior* apresentando sintomas e sinais da doença. Foi realizado o isolamento direto dos tecidos que apresentavam esporulação e isolamento com desinfestação superficial em álcool 70%, por um minuto, seguido de hipoclorito 1%, por um minuto e três lavagens rápidas em água destilada autoclavada para os tecidos que apresentavam apenas sintomas da doença. As estruturas fúngicas e os pedaços de tecido vegetal foram transferidos para placas de Petri, descartáveis, contendo Ágar-Água (AA) (Acumedia Neogen, Michigan) adicionado de Sulfato de estreptomicina (Sigma Chemical). O material foi levado a câmara de crescimento a 22 ± 2 °C. Ao apresentar crescimento micelial, cerca de 2-3 dias, fragmentos foram transferidos para placas contendo meio de Batata-Dextrose-Ágar (BDA) (Acumedia Manufacturers) e mantidas nas mesmas condições até que a identificação dos isolados fosse possível, ou seja, quando houvesse esporulação. Foram selecionados os isolados com maior produção de conídios do que de escleródios (FIGURA 1).

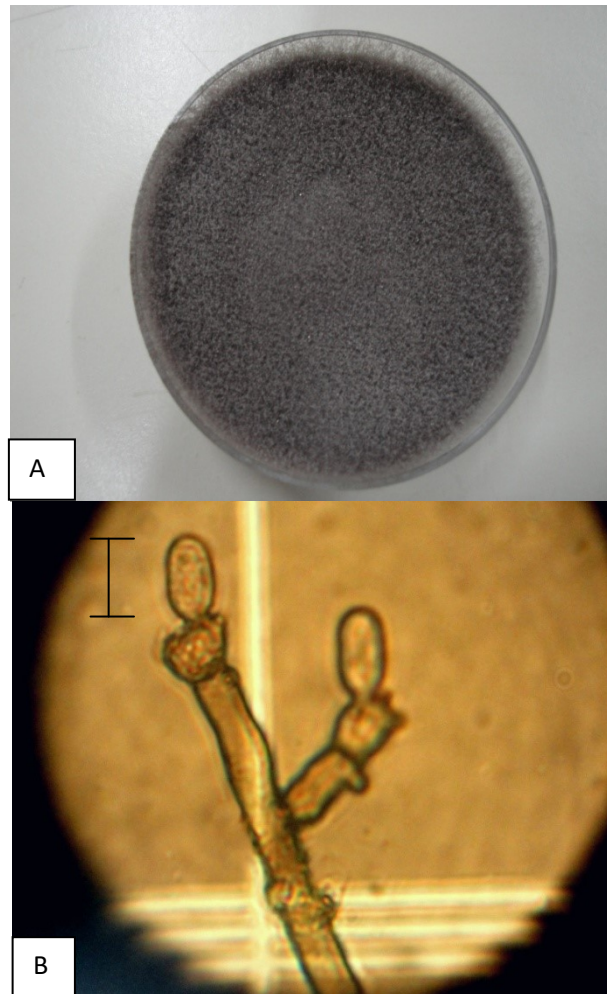
A partir de uma cultura de cinco dias crescida em BDA, fragmentos de 1 cm de diâmetro foram retirados com o auxílio de um furador de rolha e colocados assepticamente sobre lâminas de vidro, o lado apresentando crescimento micelial foi colocado para cima sobre o qual colocou-se uma lamínula flambada em álcool 70%. O material foi colocado em placas de Petri de 15 cm, sobre papel filtro umedecidos e colocados em câmara de crescimento nas mesmas condições citadas anteriormente. Após cinco dias, as lamínulas foram retiradas delicadamente e preparadas com auxílio de lactofenol e azul de algodão com posterior visualização em microscópio de luz (FIGURA 2). Todo o material utilizado foi previamente esterilizado (adaptado de ALFENAS; MAFIA, 2007). O patógeno foi identificado com bases nas suas características morfológicas de acordo com Barnett e Hunter (1998).

Figura 1 - Isolados de *Botrytis cinerea* obtidos inicialmente para a realização dos ensaios.



Fonte: Da autora(2017)

Figura 2 - *Botrytis cinerea* - esporulação abundante do patógeno aos 10 dias em placa de Petri (A) e estruturas fúngicas observadas ao microscópio de luz (B).

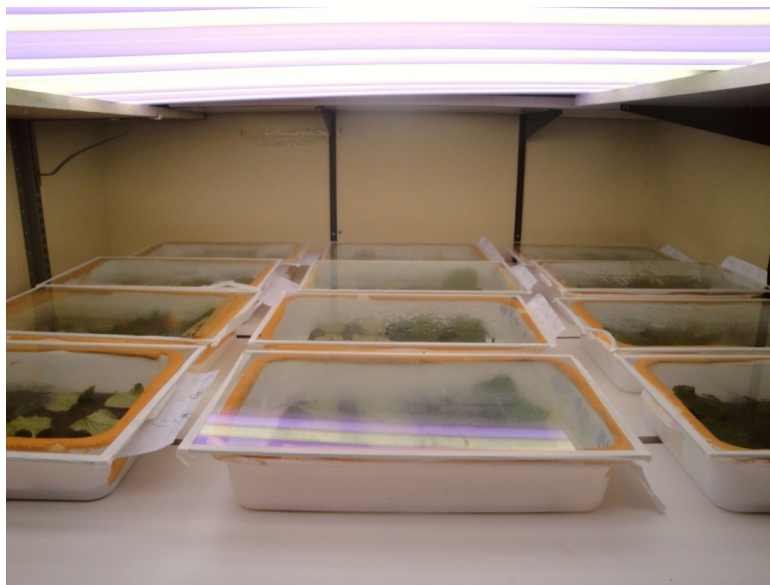


Fonte: Da autora(2017)

Os isolados que apresentaram esporulação uniforme, em até 10 dias após serem repicados em BDA, foram escolhidos para avaliar a patogenicidade nas concentrações de 10^3 , 10^4 , 10^5 e 10^6 conídios/mL. Foram utilizadas caixas plástica (30x40x5cm) com espuma fenólica embebida em água, nas quais foram

mantidas quatro folhas por concentração de inóculo. As folhas foram feridas em quatro pontos com alfinete entomológico e em cada ferimento foi depositado 10 μ L da suspensão de conídio, preparada com Tween 20 (0,05%). As caixas foram cobertas com placas de vidro com a finalidade de manter a umidade elevada (ESKES, 1982). As folhas foram submetidas a fotoperíodo de 12h e temperatura de, aproximadamente, 21 ± 2 °C em sala climatizada. Após 10 dias, foi observado qual isolado e qual concentração apresentava maior capacidade de colonização do tecido vegetal. Associada aos resultados obtidos, a escolha da concentração baseou-se também na literatura, 10^5 conídios/ml. Os sintomas observados em todas as concentrações foram iguais aos apresentados pelas plantas das quais o patógeno foi isolado (FIGURA 3). A partir das folhas apresentando abundante esporulação foi feito o reisolamento para uso nos estudos.

Figura 3 - Avaliação da patogenicidade dos isolados em sala climatizada.



Fonte: Da autora(2017)

Suspensões de conídios nas concentrações de 10^3 , 10^4 , 10^5 e 10^6 conídios/ml com Tween 20 (0,05%) foram preparadas, a partir de uma colônia de 10 dias. Dessas suspensões foram pipetados 20 μ L e transferidos para placas descartáveis (5x1cm) contendo 7 mL de Ágar-água, em quatro pontos equidistantes. As placas foram mantidas a 22 ± 2 °C. A germinação foi interrompida pela adição de 10 μ L de lactofenol adicionado de azul de algodão, após 4, 8, 12, 16 e 20 h de incubação com o intuito de se definir qual o melhor período para a avaliação da germinação do isolado. Os conídios germinados foram contados em microscópio óptico de luz. Foram considerados germinados os conídios que emitiram tubo germinativo maior do que o seu comprimento. Definiu-se que a germinação seria interrompida após 8 h para os estudos subsequentes.

Baseado no teste anterior, a partir da cultura pura com aproximadamente 10 dias, crescida em BDA, foi feita a lavagem dos conídios com auxílio da alça de Drigalski em água destilada autoclavada adicionada de Tween 20 (0.05%), a suspensão foi filtrada em gaze e sua concentração determinada em câmara de Neubauer. Foi realizada diluição seriada até a concentração 10^3 , em seguida uma alíquota de 100 μ L foi transferida para ágar-água e espalhada com alça de Drigalski, em 10 placas de 9 cm, após foram levadas à câmara de crescimento, 22 ± 2 °C, por 8 h. Foram utilizadas 10 placas de 9 cm para cada cultura. A placa foi observada em microscópio de luz, foi retirado um pequeno fragmento de meio contendo um único conídio que estivesse emitindo tubo germinativo, garantindo assim sua viabilidade. O fragmento foi obtido com o auxílio de agulhas de insulina, com a ponta em formato de bissel facilitando o procedimento, posteriormente, foi transferido para placas de Petri contendo BDA e incubadas 22 ± 2 °C por 10 dias.

O isolado foi mantido em câmara de crescimento, 22 ± 2 °C, de 10-14 dias, em meio BDA para pronto uso, durante todo o período de desenvolvimento dos ensaios. A preservação foi realizada de acordo com Castellani (1939).

3.3 Produtos e concentrações testadas para controle do patógeno

Bacillus subtilis QST-713 (Serenade, Bayer); *Bacillus pumilus* QST-2808 (Sonata, Bayer); *B. subtilis* e *Bacillus licheniformis* (C.Hansen), nas concentrações 0, 10^7 , 10^8 e 10^9 ; os óleos de café verde e torrado nas concentrações de 0, 1, 10, 100, 1000 e 10.000 ppm, exceto para o teste de germinação de conídio no qual a maior concentração não permitiu uma visualização adequada; e, bicarbonato de sódio e potássio, carbonatos de sódio e potássio nas concentrações de 0, 1, 10, 100, 1000 e 10000 ppm; óleos de café foram obtidos pela compressão dos grãos de café torrados ou *in natura* (aqui denominado verde) em uma prensa extrusora a frio (cold press expeller). A *posteriore* separados da massa de grãos em “filtro prensa” e embalados. O processo foi realizado pela empresa Linax de Araçatuba, SP; e bicarbonato de sódio, carbonato de sódio, bicarbonato de potássio e carbonato de potássio nas concentrações de 0, 1, 10, 100, 1.000 e 10.000 ppm, foram os produtos e concentrações testados.

3.4 Inibição do crescimento micelial de *B. cinerea*

Meio Batata-dextrose-ágar (BDA) foi preparado com os óleos e os sais nas concentrações de 0, 1, 10, 100, 1.000 e 10.000 ppm e, antes da autoclavagem, o pH foi ajustado para o mesmo da testemunha. Após os meios serem vertidos em placas descartáveis de 9 cm, cada placa recebeu um fragmento de micélio do patógeno, de 10 dias e 0,8 cm de diâmetro. Medições

diárias do diâmetro das colônias foram realizadas até que o crescimento da testemunha tomasse toda a placa. Cada concentração dos produtos avaliados teve cinco repetições.

3.5 Inibição da germinação de conídios de *B. cinerea*

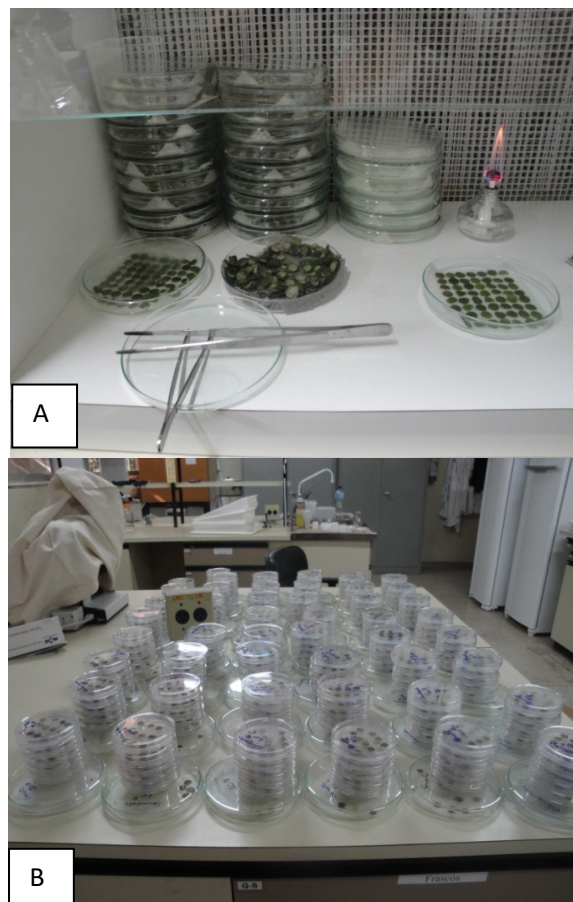
Agar-água foi preparado adicionando os óleos e os sais nas concentrações de 0, 1, 10, 100, 1.000 e 10.000 ppm, o pH do meio foi ajustado para o mesmo da testemunha antes da autoclavagem. Preparou-se a suspensão de conídios de *B. cinerea* para a obtenção final da concentração de 10^5 conídios/ml com Tween 20 (0,05%), a partir de uma colônia de 10 dias. Foram transferidos 20 μ L da suspensão em quatro pontos por placa. Para a avaliação dos produtos à base de *Bacillus* spp., sobre placas contendo Agar-água pipetou-se 10 μ L das suspensões dos agentes de controle biológico mais 10 μ L da suspensão de conídios. Todas as placas foram mantidas a 22 ± 2 °C, e tiveram a germinação interrompida pela adição de 10 μ L de lactofenol adicionado de azul de algodão, após 8 h. Foram avaliadas quatro placas por tratamento e em cada placa realizou-se a contagem de 100 conídios por gota em cada um dos quatro pontos.

3.6 Inibição da colonização de disco de folha

Para a realização desse ensaio, foi utilizada a metodologia proposta por Morandi, Sutton e Mafía (2000). Folhas da variedade Baladin foram coletadas sempre no dia inicial da elaboração dos ensaios. Discos de 1 cm de diâmetro foram cortados e desinfestados em álcool 70% por um minuto, hipoclorito de sódio 2% por um minuto e três lavagens sucessivas em água destilada e autoclavada. Os discos foram colocados em papel toalha para a remoção do excesso de água e secos em fluxo laminar. Para a acomodação dos discos de

folha e manutenção da câmara úmida, foram utilizadas placas de Petri de 15 cm e discos de papel filtro (dois por placa). O papel de filtro foi embebido em água por cerca de 30 segundos e acomodado nas placas. Cada placa recebeu 55 discos de folha. Foram avaliadas, além das concentrações dos produtos indicados anteriormente, as aplicações desses produtos de forma preventiva (24 h antes da inoculação do patógeno), simultânea (inoculação do patógeno juntamente com a aplicação dos produtos) e curativa (aplicação dos produtos 24 h após a inoculação do patógeno). Todas as placas foram preparadas no primeiro dia da elaboração dos ensaios. No último dia de montagem dos ensaios, os discos foram transferidos para placas de Petri de 9 cm, descartáveis contendo meio PCA (Paraquat, Chloramphenicol e Ágar), 11 discos por placa, em cinco placas. As placas foram mantidas por 10 dias a 22 ± 2 °C com fotoperíodo de 12 h (Grolux 40 W e lâmpadas fluorescentes 40 W a 40 cm de distância) (FIGURA 4). As avaliações foram realizadas nos 4º, 7º e 10º dias, considerando a escala de notas proposta por Peng e Sutton (1991).

Figura 4 - Acomodação dos discos de folhas de begônia após desinfestação em placas de Petri de 15 cm (A) e transferência dos discos de folha para placas contendo meio PCA (B) para avaliar o efeito de produtos alternativos sobre o controle do mofo cinzento.



Fonte: Da autora (2017)

3.7 Análise estatística

Para a análise dos resultados, foi utilizado o pacote estatístico ASSISTAT e o software Excel. As variáveis de crescimento micelial, germinação e colonização foram analisadas como experimentos fatoriais em

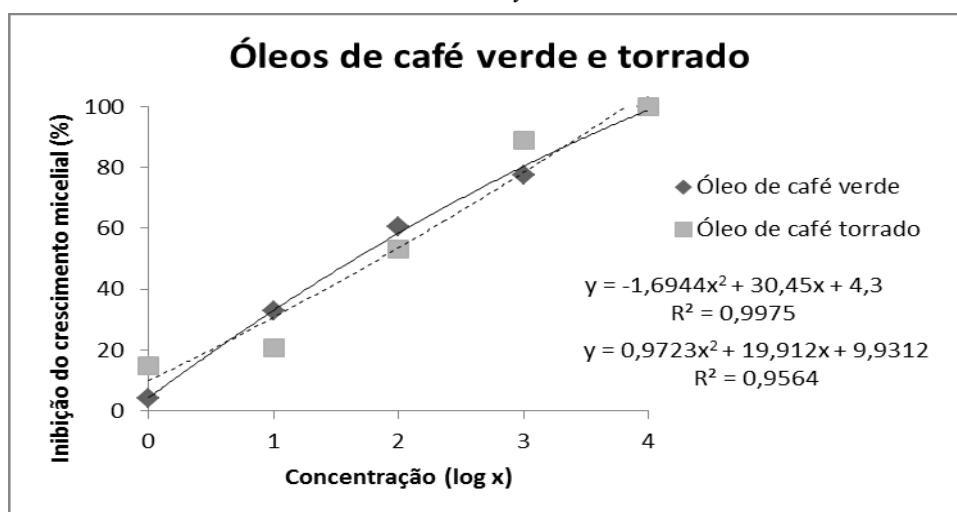
nível de 1% de probabilidade. Todos os experimentos foram repetidos duas vezes utilizando o delineamento inteiramente casualizado.

4 RESULTADOS

4.1 Inibição do crescimento micelial de *Botrytis cinerea*

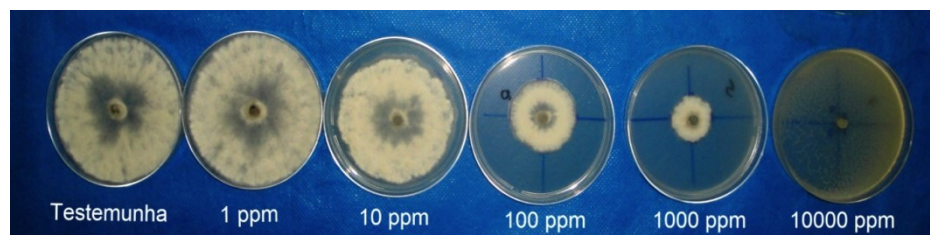
A inibição do crescimento micelial foi diretamente proporcional à concentração dos óleos de café verde e torrado (FIGURAS 5 e 6). Os óleos de café verde e torrado inibiram 100% do crescimento micelial de *Botrytis cinerea* na concentração de 10.000 ppm, até o último dia de avaliação. Nas concentrações de 1, 10, 100 e 1.000 ppm, o óleo de café torrado apresentou inibição do crescimento micelial de 14,9, 20,8%, 53,3% e 88,8%, respectivamente. Por outro lado, o óleo de café verde inibiu em 4,1%, 32,8%, 60,7% e 77,6%, respectivamente, o crescimento micelial do patógeno (FIGURAS 5 e 6).

Figura 5 - Efeito de diferentes dos óleos de café verde e torrado sobre a inibição do crescimento micelial de *Botrytis cinerea*.



Fonte: Da autora (2017)

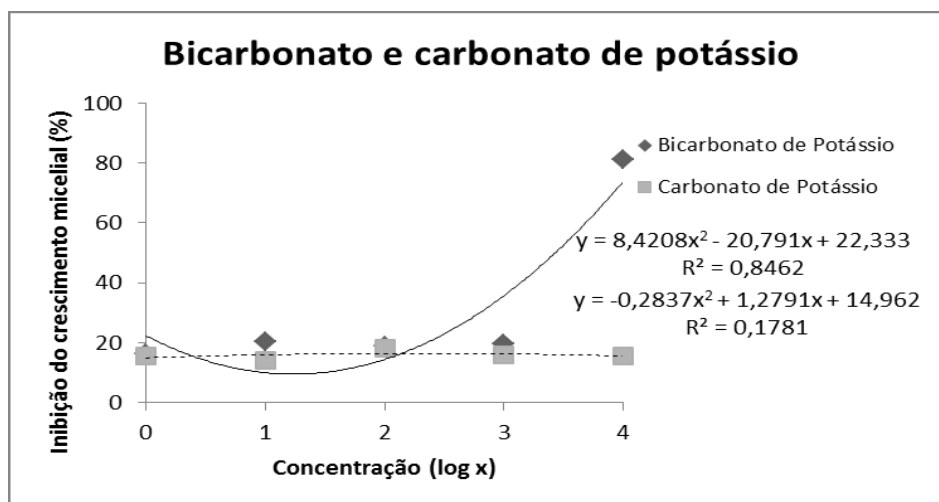
Figura 6 - Inibição do crescimento micelial de *Botrytis cinerea* em função de diferentes concentrações do óleo de café verde.



Fonte: Da autora (2017)

O bicarbonato de potássio apresentou um comportamento quadrático sobre a inibição do crescimento micelial do patógeno, e crescente, a partir de 100 ppm (FIGURA 7). Na maior concentração avaliada, 10.000 ppm, a inibição foi de 81,3% no crescimento micelial. O carbonato de potássio, independentemente da concentração, manteve um valor médio de 15,8% de inibição sobre crescimento micelial (FIGURA 7).

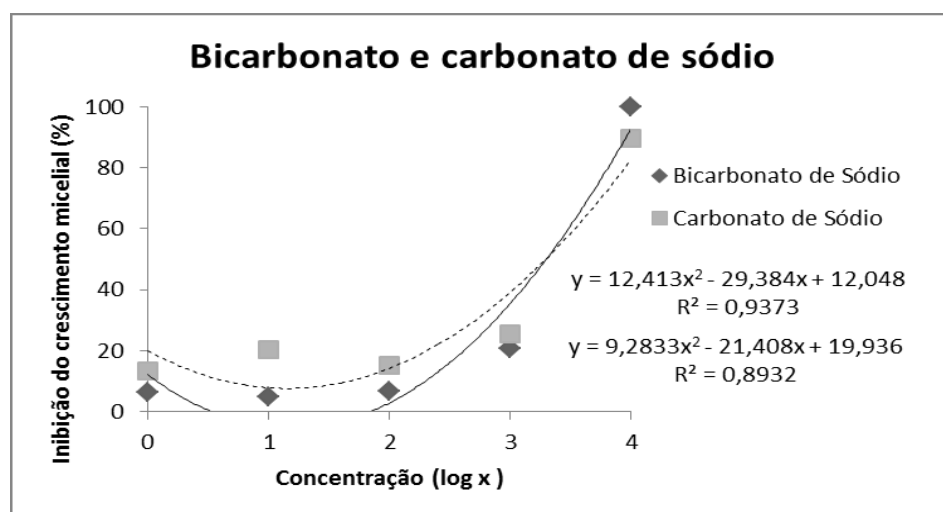
Figura 7 - Efeito dos sais bicarbonato e carbonato de potássio sobre a inibição do crescimento micelial de *Botrytis cinerea*.



Fonte: Da autora (2017)

Os bicarbonato e carbonato de sódio apresentaram resposta quadrática na inibição do crescimento micelial do patógeno. O bicarbonato de sódio na concentração de 10.000 ppm inibiu em 100% o crescimento. O carbonato de potássio na concentração de 10.000 ppm inibiu em 89,6% o crescimento de *B. cinerea* (FIGURA 8). Nas menores concentrações, os dois não inibiram significativamente o patógeno.

Figura 8 - Efeito de bicarbonato e carbonato de sódio sobre a inibição do crescimento micelial de *Botrytis cinerea*.



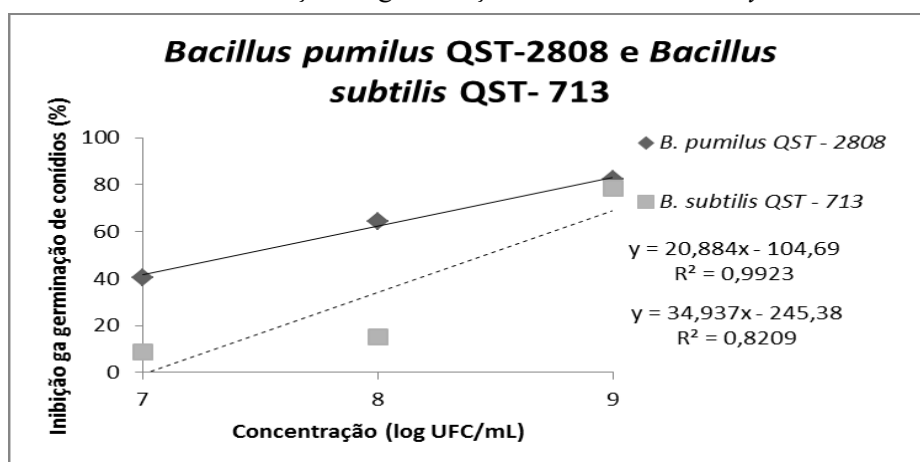
Fonte: Da autora (2017)

4.2 Inibição da germinação de conídios de *Botrytis cinerea*

Na concentração de 10^9 UFC/mL, o *Bacillus pumilus* QST-2808 inibiu a germinação dos conídios em 82,2%, enquanto que o *Bacillus subtilis* QST-713 inibiu 78,5%. Nas concentrações de 10^8 e 10^7 UFC/mL, as inibições foram de 64,6 e 40,4% para *Bacillus pumilus* QST-2808 e 15,3% e 8,7% para o *Bacillus subtilis* QST-713. *Bacillus licheniformis* inibiu a germinação de conídios em

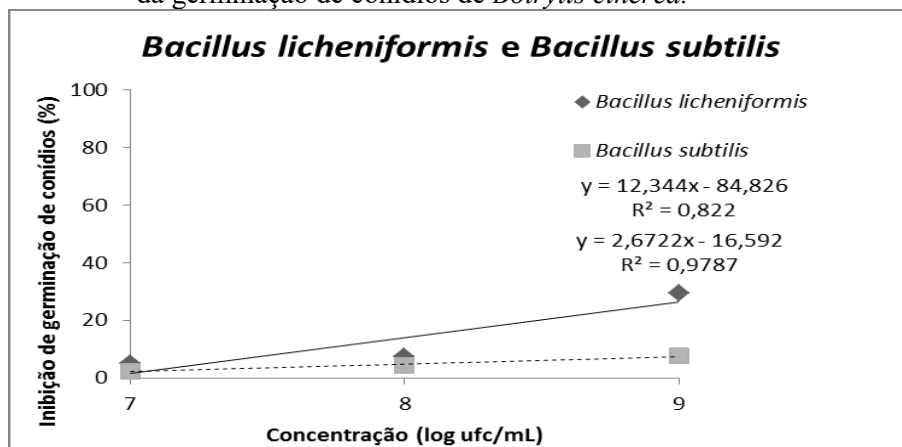
4,9%, 7,3% e 29,6% nas concentrações de 10^7 , 10^8 , e 10^9 UFC/mL respectivamente. Enquanto o *Bacillus subtilis* inibiu na maior concentração avaliada apenas 7,7% (FIGURA 10).

Figura 9 - Efeito de *Bacillus pumilus* QST-2808 e *Bacillus subtilis* QST-713 sobre o a inibição da germinação de conídios de *Botrytis cinerea*.



Fonte: Da autora (2017)

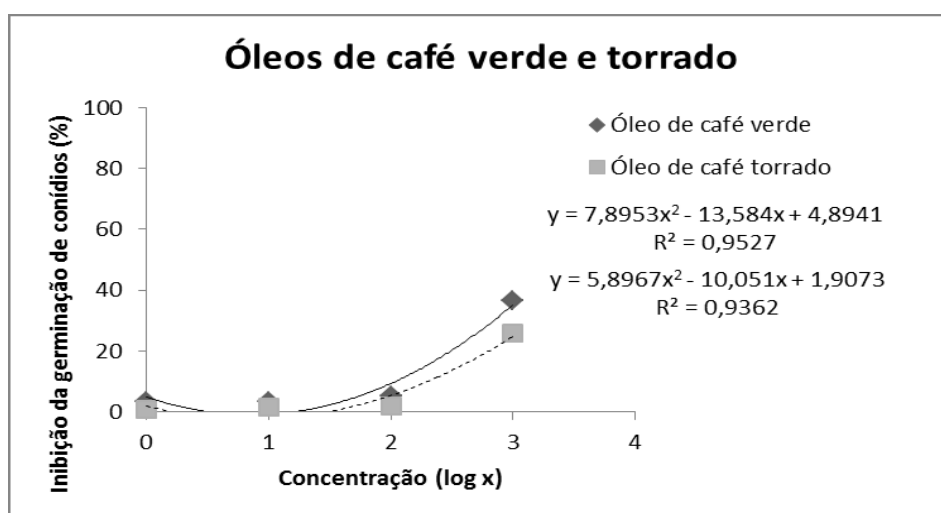
Figura 10 - Efeito de *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis* sobre a inibição da germinação de conídios de *Botrytis cinérea*.



Fonte: Da autora (2017)

O óleo de café verde inibiu na germinação de conídios em 3,5%, 3,3%, 5,2% e 36,6% nas concentrações de 1, 10, 100 e 1.000 ppm, respectivamente. Enquanto que o óleo de café torrado apresentou inibição de 0,70, 1,4%, 1,8% e 26,0%, respectivamente (FIGURA 11). Na maior concentração dos dois óleos, não foi possível realizar a contagem dos esporos germinados.

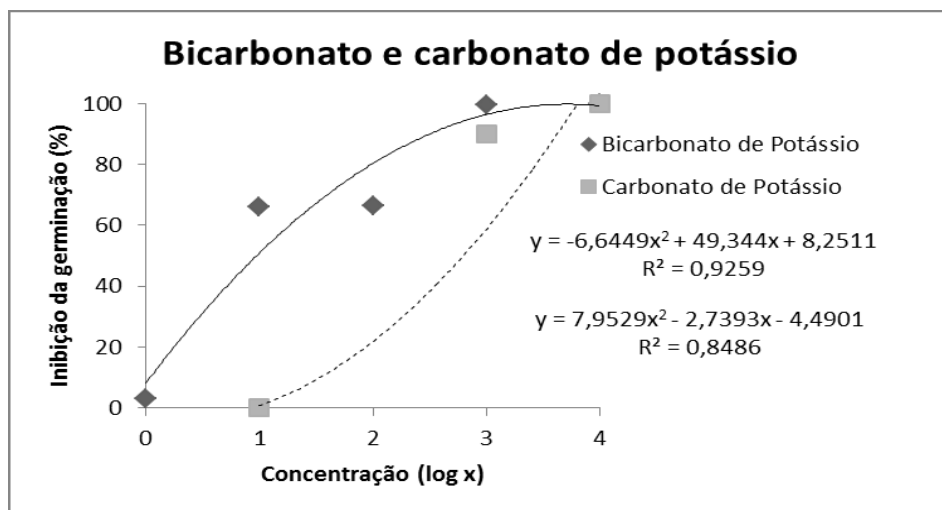
Figura 11 - Efeito dos óleos de café verde e torrado sobre a inibição da germinação de conídios de *Botrytis cinerea*.



Fonte: Da autora (2017)

Bicarbonato e carbonato de potássio inibiram 100% a germinação de esporos na concentração de 10.000 ppm (FIGURA 12). O bicarbonato de potássio inibiu em 66,2%, 66,4% e 99,7% a germinação de conídios nas concentrações de 10, 100 e 1000 ppm, respectivamente (FIGURA 12).

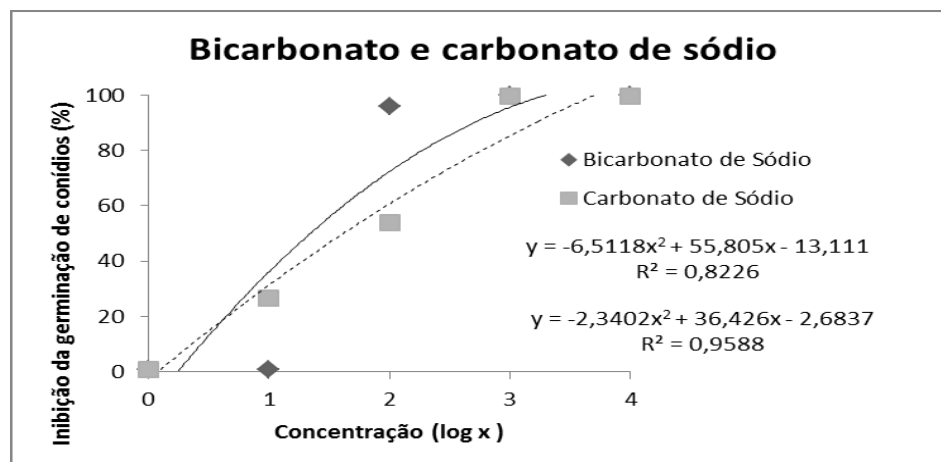
Figura 12 - Efeito de bicarbonato e carbonato de potássio na inibição da germinação de conídios de *Botrytis cinerea*.



Fonte: Da autora (2017)

Bicarbonato de sódio inibiu a germinação dos conídios de *B. cinerea* em 0,8%, 95,8% e 99,9% nas concentrações de 10, 100, 1000 e 10.000 ppm, respectivamente. Por outro lado, carbonato de sódio inibiu 53,7%, 99,6% e 99,7% a germinação dos conídios nas concentrações de 100, 1000 e 10.000 ppm, respectivamente (FIGURA 13).

Figura 13 - Efeito de bicarbonato e carbonato de sódio sobre a inibição da germinação de conídios de *Botrytis cinerea*.

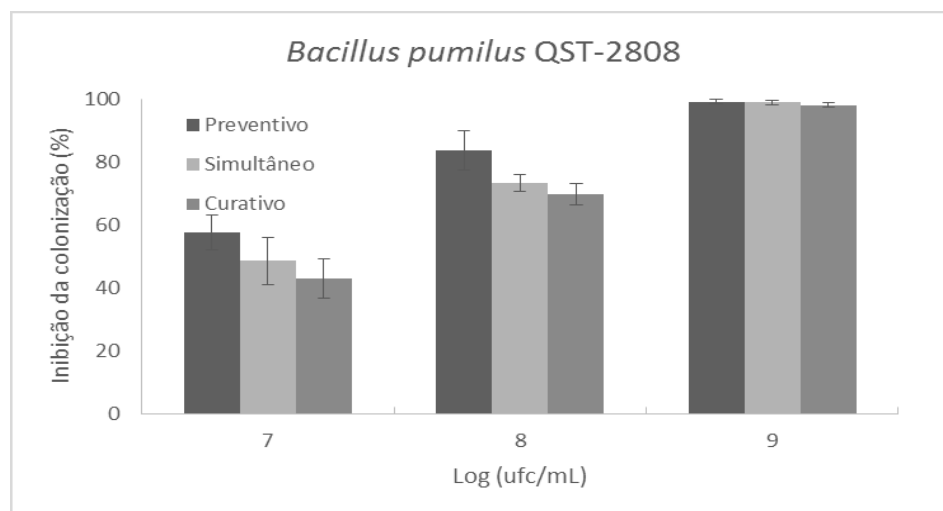


Fonte: Da autora (2017)

4.3 Inibição da colonização de *B. cinerea* em discos de folhas de begônia

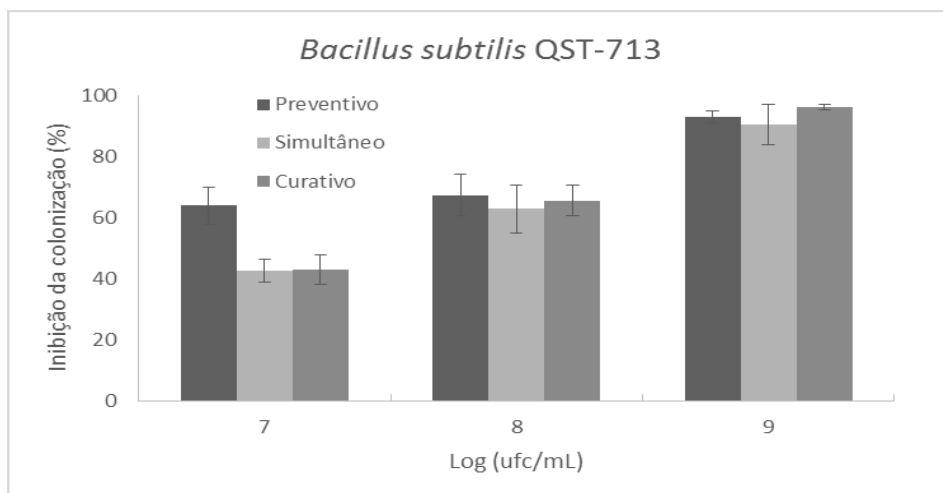
Bacillus pumilus QST-2808, nas concentrações de 10^7 , 10^8 e 10^9 UFC/mL aplicadas, preventivamente, apresentou inibição de colonização dos discos de folha de begônia de 57,5%, 83,7% e 99,2%, respectivamente. As aplicações preventivas e, simultaneamente, dos dois organismos foram mais efetivas que a curativa nas duas menores concentrações. Por outro lado, na maior concentração avaliada não houve diferença estatística entre os períodos de aplicação (FIGURA 14). *Bacillus subtilis* QST-713 diminuiu a colonização dos discos de folhas por *Botrytis* de acordo com o aumento da concentração utilizada. Para as concentrações de 10^8 e 10^9 UFC/mL, aplicadas preventivamente, houve uma inibição de colonização dos discos de folha de 67,4% e 92,9%, respectivamente. Não houve diferença estatística entre os períodos de aplicação dentro de cada concentração. Para a menor concentração testada, o melhor controle foi o preventivo (63,9%) (FIGURA 15).

Figura 14 - Efeito de *Bacillus pumilus* QST-2808 aplicado preventivamente, simultaneamente e curativamente na inibição da colonização dos discos de folhas de begônia por *Botrytis cinerea* e seus respectivos erros.



Fonte: Da autora (2017)

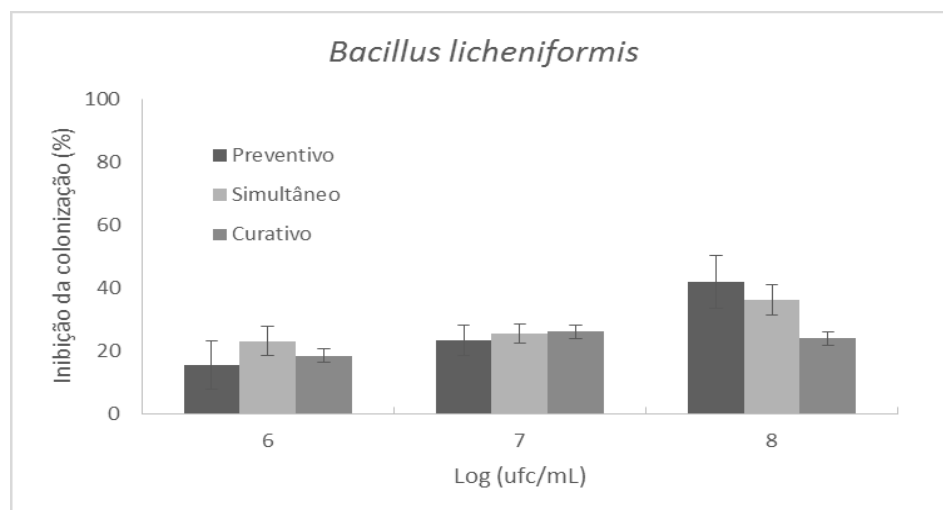
Figura 15 - Efeito de *Bacillus subtilis* QST-713 aplicado preventivamente, simultaneamente e curativamente na inibição da colonização dos discos de folhas de begônia por *Botrytis cinerea* e seus respectivos erros.



Fonte: Da autora (2017)

Bacillus licheniformis, na concentração de 10^8 UFC/mL, aplicado preventivamente, controlou em 41,99 % e simultaneamente em 36,2% a colonização dos discos de begônia (FIGURA 16). Para as concentrações de 10^6 e 10^7 UFC/mL, esse antagonista controlou em torno de 20% a colonização, independentemente, do momento de sua aplicação.

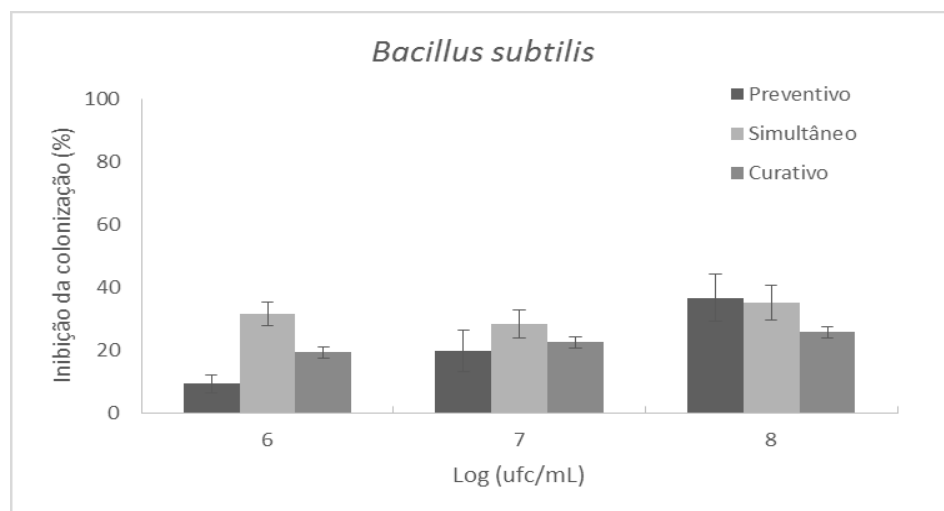
Figura 16 - Efeito de *Bacillus licheniformis* aplicado preventivamente, simultaneamente e curativamente na inibição da colonização dos discos de folhas de begônia por *Botrytis cinerea* e seus respectivos erros.



Fonte: Da autora (2017)

Bacillus subtilis diminuiu a colonização dos discos de folhas por *Botrytis* de acordo com o aumento da concentração utilizada (FIGURA 17). Para as duas maiores concentrações avaliadas 10^7 e 10^8 , não houve diferença estatística entre os períodos de aplicação. Na menor concentração testada, a aplicação simultânea inibiu 31,6% a colonização dos discos de folha (FIGURA 17).

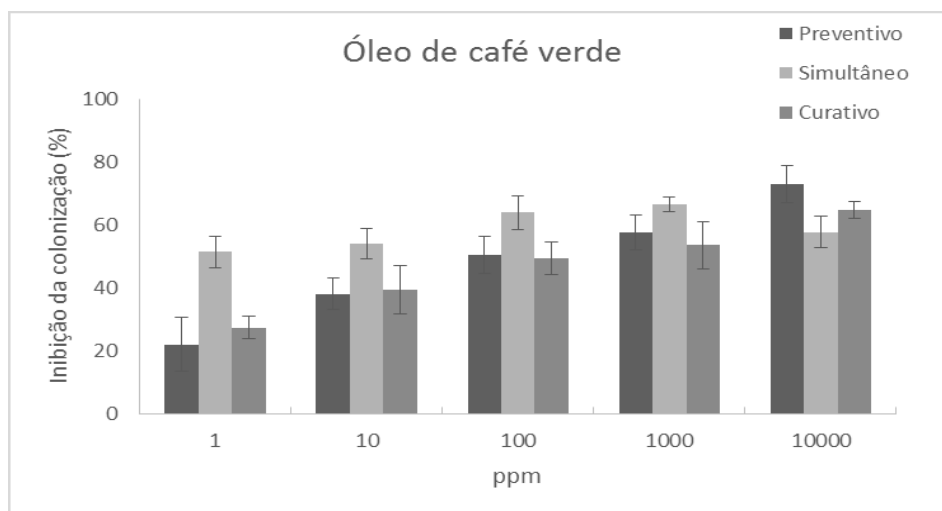
Figura 17 - Efeito de *Bacillus subtilis* aplicado preventivamente, simultaneamente e curativamente na inibição da colonização dos discos de folhas de begônia por *Botrytis cinerea* e seus respectivos erros.



Fonte: Da autora (2017)

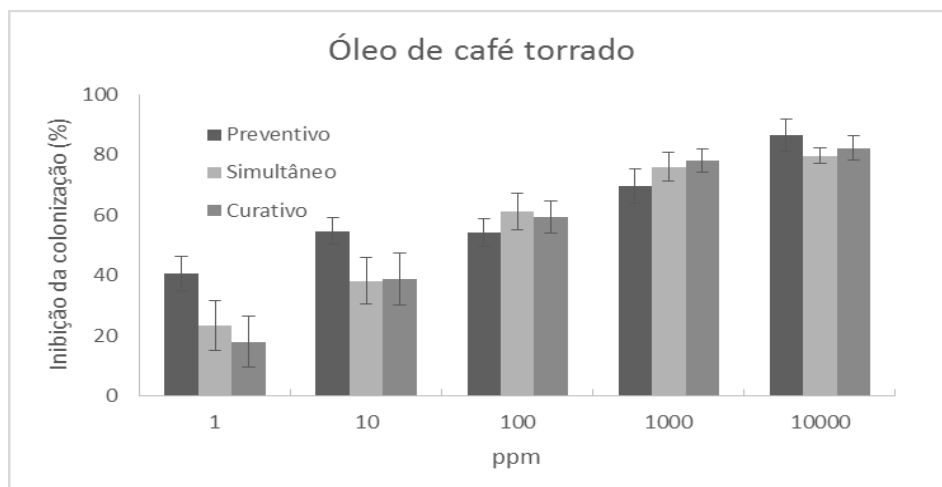
Nos ensaios realizados com óleo de café verde, foi observada a diminuição da colonização dos discos de folhas por *Botrytis*, de acordo com o aumento da concentração utilizada. Para as concentrações entre 1 e 1.000 ppm, houve uma maior inibição da colonização dos discos de folha na aplicação simultânea, variando entre 51,4 e 66,4%. Na concentração de 10.000 ppm, a aplicação preventiva inibiu 73,1% da colonização dos discos de folha (FIGURA 18). O óleo de café torrado diminuiu a colonização dos discos de folhas por *Botrytis* de acordo com o aumento da concentração utilizada. Para as concentrações de 1, 10 e 10.000 ppm, houve uma maior inibição da colonização dos discos de folha na aplicação preventiva, 40,6%, 54,7% e 86,65%, respectivamente. Para as concentrações entre 100 e 10.000 ppm, a inibição variou de 54,2% a 86,6% (FIGURA 19).

Figura 18 - Efeito de óleo de café verde aplicado preventivamente, simultaneamente e curativamente na inibição da colonização dos discos de folhas de begônia por *Botrytis cinerea* e seus respectivos erros.



Fonte: Da autora (2017)

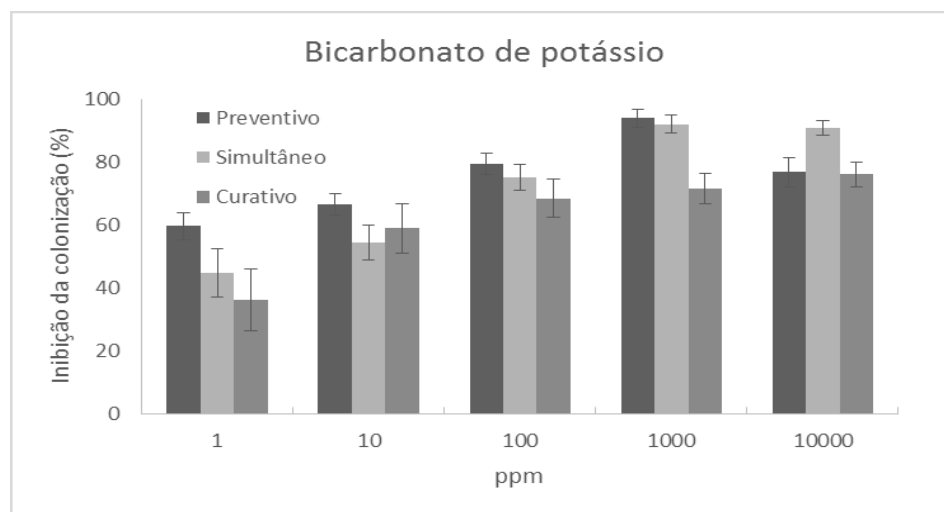
Figura 19 - Efeito de óleo de café torrado aplicado preventivamente, simultaneamente e curativamente na inibição da colonização dos discos de folhas de begônia por *Botrytis cinerea* e seus respectivos erros.



Fonte: Da autora (2017)

Nos ensaios realizados com bicarbonato de potássio, observou-se uma maior inibição da colonização dos discos de folha de begônia, quando aplicado preventivamente nas concentrações de 1 a 1.000 ppm, variando a inibição de 59,7% a 93,8% e, para concentração de 10.000 ppm, foi observada a inibição de 76,7%. Para o tratamento simultâneo, foram observados valores crescentes de inibição para as concentrações de 1 a 100 ppm, correspondendo a 44,8% e 75,8%. As concentrações de 1.000 e 10.000 ppm apresentaram valores de 92,0% e 90,8%, respectivamente. O tratamento curativo apresentou o menor controle quando comparado ao preventivo e ao simultâneo, variando de 36,1% a 76,1% para as concentrações de 1 a 10.000 ppm (FIGURA 20).

Figura 20 - Efeito de bicarbonato de potássio aplicado preventivamente, simultaneamente e curativamente na inibição da colonização dos discos de folhas de begônia por *Botrytis cinerea* e seus respectivos erros.

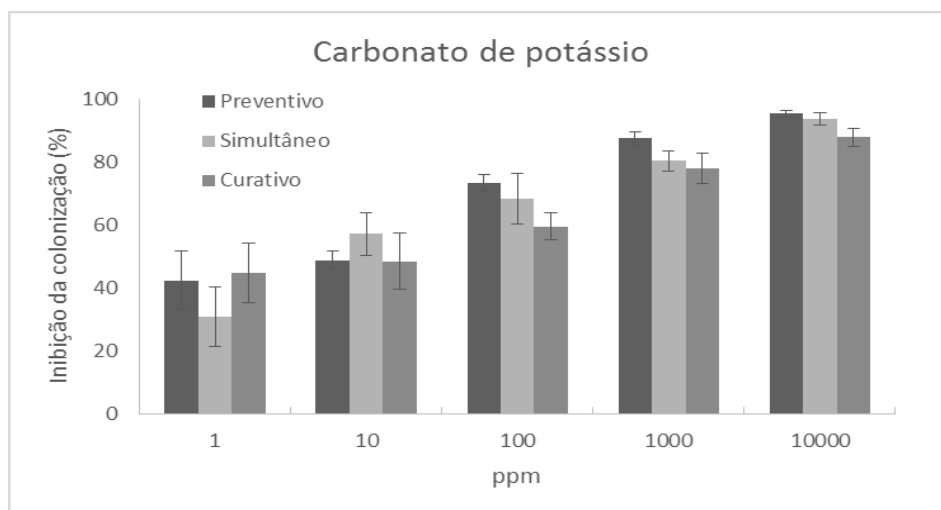


Fonte: Da autora (2017)

Para o carbonato de potássio, o efeito na inibição da colonização de discos de folhas foi diretamente proporcional às concentrações utilizadas,

independentemente, do momento de aplicação (FIGURA 21). A aplicação simultânea apresentou um controle intermediário entre as aplicações preventiva e curativa para as mesmas concentrações e a inibição variou de 68,2% a 93,7%. A aplicação curativa teve o menor controle, que variou de 59,5% a 87,8% (FIGURA 21).

Figura 21 - Efeito de carbonato de potássio aplicado preventivamente, simultaneamente e curativamente na inibição da colonização dos discos de folhas de begônia por *Botrytis cinerea* e seus respectivos erros.

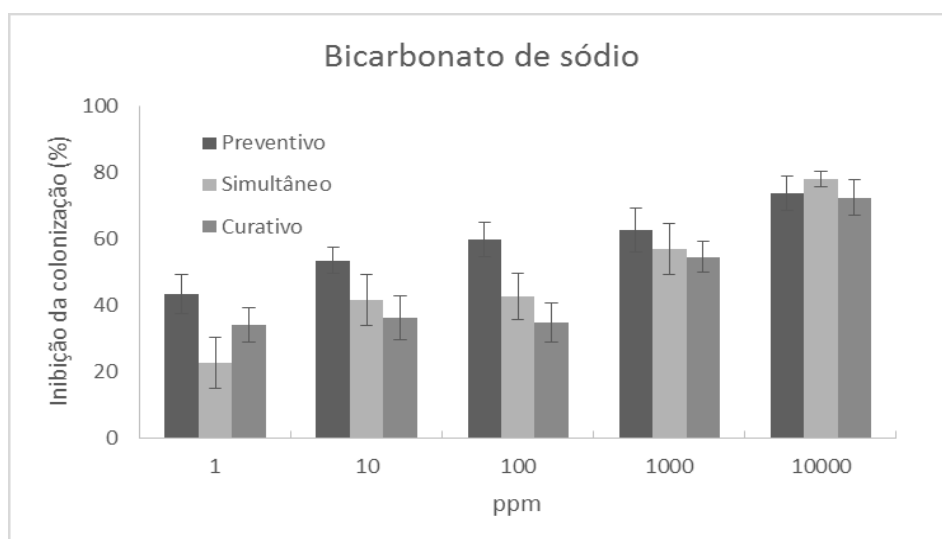


Fonte: Da autora (2017)

Nos estudos com bicarbonato de sódio, o maior controle foi observado com a aplicação preventiva, nas concentrações de 1 a 1.000 ppm, as inibições variaram de 43,4% a 62,5% continuando crescente até a concentração de 10.000 ppm (73,8%). Porém nessa concentração, o melhor tratamento foi o simultâneo com 78% de inibição (FIGURA22). Carbonato de sódio na concentração de 10.000 ppm inibiu a colonização de discos por *B. cinerea* em 83,7%, quando aplicado preventivamente. Para as concentrações intermediárias, a inibição

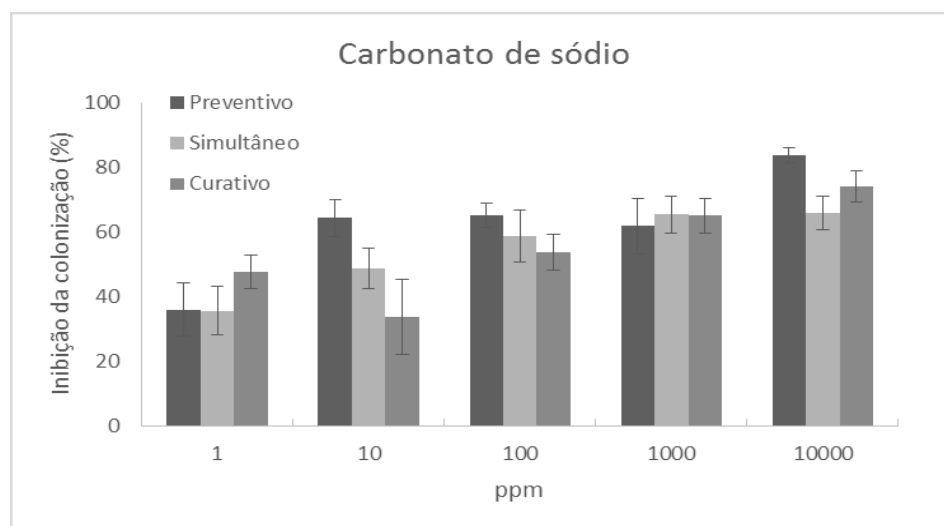
variou de 64,25 a 61,85%. Carbonato de sódio na concentração de 10.000 ppm aplicado simultaneamente e curativamente inibiu a colonização dos discos em 65,7% e 73,9%, respectivamente.

Figura 22 - Efeito de bicarbonato de sódio aplicado preventivamente, simultaneamente e curativamente na inibição da colonização dos discos de folhas de begônia por *Botrytis cinerea* e seus respectivos erros.



Fonte: Da autora (2017)

Figura 23 - Efeito de carbonato de sódio aplicado preventivamente, simultaneamente e curativamente na inibição da colonização dos discos de folhas de begônia por *Botrytis cinerea* e seus respectivos erros.



Fonte: Da autora (2017)

5 DISCUSSÃO

Todos os produtos à base de *Bacillus* demonstraram eficiência em inibir a germinação de conídios de *Botrytis cinerea*, agente causal do mofo cinzento em begônia. Quando comparado os produtos comerciais, foi observado que o *Bacillus pumilus* QST-2808 inibiu 3,74% a mais a germinação de conídios do que o *Bacillus subtilis* QST-713 na concentração de 10^9 UFC/mL, enquanto na menor concentração, 10^7 UFC/mL, essa diferença foi de 6,57%. Ao realizar a mesma comparação entre os probióticos, foi observada uma inibição 21,9% maior sobre a germinação de conídios por *Bacillus licheniformis* na concentração de 10^8 UFC/mL em relação ao *Bacillus subtilis*.

Nos ensaios em discos de folha de begônia, onde se avaliou o efeito dos microrganismos sobre a colonização do patógeno, os produtos comerciais *B. subtilis* QST-713 e *B. pumilus* QST-2808 foram mais eficientes controlando 92,9% e 99,2%, respectivamente, na concentração de 10^9 UFC/mL. Por outro lado, os *Bacillus* comercializados como probióticos, quando aplicados preventivamente na concentração de 10^8 UFC/mL, foi observado que *B. subtilis* inibiu em 31,7% e *B. licheniformis* em 41,9%.

Os isolados de *Bacillus* utilizados diferem quanto à espécie, isolado e à forma de comercialização. *B. subtilis* QST-713 e *B. pumilus* QST-2808 são apresentados na formulação líquida (fermentado). Portanto, além das células do microrganismo os produtos possuem metabólitos na sua formulação. O *B. subtilis* QST-713 produz iturina, agrastatina/plipastatina e surfactina, entre outros, que inibem a germinação dos esporos e o crescimento do tubo germinativo de fitopatógenos como *Sclerotinia sclerotiorum*, *Mycosphaerella fijiensis*, *Colletotrichum gloeosporioides*, entre outros. Por outro lado, *B. pumilus* QST-2808 produz açúcares aminados com ação antifúngica e é indicado para controle de patógenos de diversos grupos, como ferrugens, míldios e oídios

entre outros (BETTIOL et al., 2012). Os isolados de *B. subtilis* e *B. licheniformis* comercializados para probióticos possuem apenas células em suas formulações.

Para o controle de patógenos do , *B. subtilis* tem se mostrado comprovadamente eficiente, mostra-se necessária a sua introdução e o seu estabelecimento na superfície da planta, devendo ser capaz de colonizar e multiplicar-se a fim de competir pelos sítios de infecção antes do patógeno (FOKKEMA, 1993). Ensaio *in vitro* com formulações em pó-molhável de *B. subtilis* demonstraram redução de 70% para 5% na taxa de infecção do mofo cinzento em folhas de morango, quando comparada a testemunha, os resultados foram mais significativos para as aplicações realizadas, preventivamente (HANG et al., 2005). Resultados similares foram obtidos por Lee et al. (2006) para formulações à base *B. licheniformis*, onde a severidade da doença foi reduzida quando comparada ao controle químico obtido no cultivo convencional.

Dentre os principais mecanismos de ação do gênero, destacam-se a competição e a antibiose, atuando na inibição da germinação de esporos, no crescimento do tubo germinativo, no desenvolvimento micelial e protegendo a superfície da planta e também pela indução de resistência no hospedeiro, além de atuar preventivamente e curativamente (COPING, 2004; FOKKEMA, 1993). Touré et al. (2003) observaram que os metabólitos são produzidos em diferentes fases de desenvolvimento de isolados de *B. subtilis*: a surfactina para alguns isolados é produzida apenas durante a fase log; a produção de iturinas e fengicinas ocorre na fase estacionária. Portanto, antes desse agente de biocontrole agir por antibiose, é necessário que se estabeleça e encontre condições de desenvolvimento. Outros mecanismos podem estar envolvidos na inibição da germinação e colonização como, por exemplo, o fato de algumas espécies de *Bacillus* produzirem compostos voláteis tóxicos a fitopatógenos (LEELASUPHAKUL; HEMMANEE; CHUENCHITT, 2008). Guetsky et al.

(2002) observaram o efeito fungistático de voláteis produzidos por *Bacillus pumilus* sobre *B. cinerea*.

Também foram analisados os óleos de café verde e torrado que apresentaram resultados promissores quanto à inibição da germinação de esporos, do crescimento micelial e da colonização de discos de folha com *Botrytis*. Ambos os óleos foram capazes de inibir 100% do crescimento micelial na concentração de 10.000 ppm. Entretanto, a germinação de conídios por óleo de café verde foi de 36,5%, ou seja, 10,5% maior que a inibição ocasionada pelo óleo de café torrado a 1.000 ppm. Quando avaliados em discos de folhas, ambos os óleos inibiram a colonização, o óleo de café verde inibiu 66,5% e 73,1%, quando aplicado simultaneamente e preventivamente com os conídios na concentração de 1.000 ppm. O óleo de café torrado inibiu a colonização na concentração de 10.000 ppm em 86,6%, na aplicação preventiva. São escassos os trabalhos com óleos de café formulados. Entretanto, Dorighello et al. (2015) observaram 100% de inibição da germinação de uredósporos de *Phakopsora phakyrhizi* nas concentrações de 1 e 2 % pelos óleos de café verde e torrado, assim como nas concentrações de 0,5 e 1% associados a subdose de fungicida. Houve também a diminuição da severidade de ferrugem asiática da soja em folhas destacadas sob condições controladas quando comparada a testemunha. Em casa de vegetação, foi observada uma ligeira redução da Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença para concentrações utilizadas sem fungicida. Em mistura com subdoses de fungicidas, os óleos apresentaram efeito semelhante ao controle químico. Medice (2011), trabalhando com os óleos de café na forma bruta, ou seja, sem terem passado pelo processo de formulação, demonstrou que esses produtos foram eficientes no controle do oídio da soja nas concentrações de 0,5%; 1% e 2%. Esse é o primeiro relato envolvendo óleos de café formulados para o controle de *B. cinerea*. Dorighello (2013) também os utilizou em um patossistema diferente. Novos estudos são necessários visando a elucidar

os mecanismos de ação pelos quais esses produtos atuam, o período pelo qual se mantém eficiente, o princípio ativo, entre outros.

O carbonato de potássio foi eficiente em inibir o crescimento micelial do patógeno, ou seja, de 81,3% a 10.000 ppm. Bicarbonato e carbonato de potássio inibiram em 100% a germinação de conídios na concentração de 10.000 ppm. Para a colonização em discos de folha, o bicarbonato de potássio, quando aplicado preventivamente, inibiu 76,7% a colonização dos discos de begônia por *Botrytis* na concentração de 1.000 ppm, 90,8% a 10.000 ppm aplicado simultaneamente aos esporos do patógeno. Enquanto, que o carbonato de potássio inibiu, quando aplicado preventivamente, 95,3% da colonização dos discos a 10.000 ppm.

O bicarbonato de sódio inibiu 100% e 99,9%, respectivamente, o crescimento micelial e a germinação de conídios de *B. cinerea* a 10.000 ppm. O carbonato de sódio inibiu a germinação dos conídios em 99,6% na concentração de 10.000 ppm. O bicarbonato de sódio controlou 77,9% a colonização dos discos de begônia por *Botrytis* quando aplicado simultaneamente na concentração de 10.000 ppm, enquanto que o carbonato de sódio aplicado preventivamente controlou 83,7% da colonização na mesma concentração. Sais como os bicarbonatos apresentam amplo espectro antifúngico. Tal eficiência tem sido comprovada pela redução de incidência de patógenos como *Penicillium digitatum* em citros, *Sphaerotheca fuliginea* em pepino e abobrinha (SMILANICK et al., 1999; ZIV; ZITTER, 1992). Experimentos realizados *in vitro* demonstraram que o bicarbonato de sódio reduziu ligeiramente as unidades formadoras de colônias de *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium graminearum* e *Penicillium griseofulvum* de grãos de milho tratados, enquanto que o bicarbonato de amônio reduziu amplamente esses mesmos fungos deterioradores (MONTEVILLE; SHIH, 1991).

Ziv e Zitter (1992) observaram resultados semelhantes aos obtidos no presente estudo, quanto ao efeito prejudicial de bicarbonatos no crescimento *in vitro* de diversos fitopatógenos foliares das cucurbitáceas como *Alternaria cucumerina*, *Colletotrichum orbiculare*, *Didymella bryoniae* e *Ulocladium cucurbitae*. De acordo com Spadaro, Garibaldi e Gullino (2004), frutos de maçã tratados com bicarbonato de sódio apresentaram menor incidência de *Penicillium expansum*, e na associação com o agente de controle biológico *Metschnikowia pulcherrima*, a diferença de controle em relação aos frutos não tratados foi de 57%. Os bicarbonatos de amônio, potássio e sódio alteraram, significativamente, o crescimento *in vitro* de *Botrytis cinerea* em concentrações de 20 mM. Observou-se a diminuição gradativa do crescimento das colônias de acordo com o aumento da concentração dos sais. Nenhum crescimento radial foi observado para NaHCO_3 a 50 mM, para KHCO_3 a 60 mM e para NH_4HCO_3 a 20 mM (PALMER; HORST; LANGHANS, 1997). Os bicarbonatos são capazes de interferir na germinação dos conídios, causar a ruptura da sua parede celular, induzir anomalias morfológicas, inibir a formação dos conidióforos, reduzir o número de conídios produzidos nos conidióforos, assim como alterar o processo de alongação das hifas. Foi observado conjuntamente com tais fatores a diminuição da patogenicidade e a incidência de oídio em plantas de abobrinha. O veículo de aplicação do produto em concentrações elevadas precisa considerar a possibilidade da cristalização na superfície das plantas evitando possíveis danos (HOMMA; ARIMOTO; MISATO, 1981). Os resultados obtidos nos diversos estudos desse trabalho indicam que esses sais apresentam potencial para serem incluídos em programas de manejo do mofo cinzento em diversas plantas ornamentais.

É importante considerar que para todos os produtos alternativos e biológicos testados, a aplicação preventiva foi mais eficiente do que a aplicação simultânea ou após a inoculação do patógeno na colonização dos discos foliares

de begônia com *B. cinerea*. Esse resultado indica que esses produtos necessitam ser utilizados preventivamente e, que, possivelmente, não induzam a resistência do hospedeiro. Entretanto, essa afirmação necessita ser buscada em estudos com o hospedeiro e em condições de cultivo dessa planta ornamental.

6 CONCLUSÕES

- a) *Bacillus pumilus* QST- 2808, *Bacillus subtilis* QST-713, *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis* inibiram a germinação de conídios de *B. cinerea*.
- b) *Bacillus pumilus* QST-2808 controlou em 99,2% a colonização de discos de folhas de begônia na concentração de 10^9 UFC/mL, quando aplicado preventivamente.
- c) Os óleos de café verde e torrado inibem tanto o crescimento micelial, quanto a germinação de conídios de *B. cinerea*.
- d) Óleo de café torrado, aplicado preventivamente, controlou a colonização de disco de folha de begônia por Botrytis em 86,6%.
- e) Carbonato de potássio inibiu o crescimento micelial e a germinação de esporos em 81,3% e 100% na concentração de 10.000 ppm, respectivamente.
- f) Carbonato de potássio, aplicado preventivamente na concentração de 10.000 ppm, controlou a colonização dos discos de folha de begônia por Botrytis em 95,3%.
- g) Bicarbonato de sódio inibiu em 100% o crescimento micelial de Botrytis na concentração de 10.000 ppm.
- h) Bicarbonato e carbonato de sódio inibiram a germinação de conídios de Botrytis acima de 95% em concentrações superiores a 100 ppm.
- i) Carbonato de sódio, aplicado preventivamente na concentração de 10.000 ppm, controlou em 83,7% a colonização de discos de folhas de begônia por Botrytis.

REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5th ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005. 822 p.

ALEXANDRE, M. A. V.; DUARTE, L. M. L. Aspectos fitopatológicos de plantas ornamentais. Boletim Técnico - Instituto Biológico, São Paulo, n. 20, p. 1-73, maio, 2007.

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em fitopatologia**. Viçosa: Editora UFV, 2007. 382 p.

ANEFALOS, L. C.; GUILHOTO, J. J. M. Estrutura do mercado brasileiro de flores e plantas ornamentais. **Revista de Agricultura**, São Paulo, v. 50, n. 2, p. 41-63, 2003.

BAKER, K. F.; COOK, R. J. **Biological control of plant pathogens**. San Francisco: Willian H. Freeman, 1974. 433 p.

BARDAS, G. A.; MYRESIOTIS, C. K.; KARAOGLANIDIS, G. S. Stability and fitness of anilinopyrimidine-resistant strains of *Botrytis cinerea*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 98, n. 4, p. 443-450, Apr. 2008.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 4. ed. Saint Paul: Amer Phytopathological Society, 1998. 240 p.

BEEVER, R. E.; WEEDS, P. L. Taxonomy and genetic variation of *Botrytis* and *Botryotinia*. In: COLEY-SMITH, J. R.; VERHOEFF, W. R.; JARVIS, W. R. (Org.). **The biology of botrytis**. London: Academic Press, 1980. p. 41-81.

BETTIOL, W. et al. **Produtos comerciais a base de agentes de biocontrole de doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2012. 155 p. (Documentos, 88).

BETTIOLL, W.; GHINI, R.; MORANDI, M. A. B. Alguns métodos alternativos para o controle de doenças de plantas disponíveis no Brasil. In: VENZON, M.; PAULA JÚNIOR, T. J.; PALLINI, A. **Controle alternativo de pragas e doenças**. Viçosa: EPAMIG, 2005. p. 163-184.

BETTIOL, W. Seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos. In: BETTIOL, W. (Org.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa, 1991. p. 223-236.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle biológico. In: BERGAMIM, A. F.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, p. 717-728.

BRILMAYER, B. An introduction to the begonia family. In: GRAF, A. B. **Exotica 3: pictorial cyclopedia of exotic plants**. Rutherford: Roehrs, 1963. 1823 p.

CARVALHO, V. L.; CUNHA, R. L.; SILVA, N. R. N. Alternativas de controle de doenças do cafeeiro. **Coffee Science**, Lavras, v. 7, n. 1, p. 42-49, jan./abr. 2012.

CASTELLANI, A. A. The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. **Journal of Tropical Hygiene and Medicine**, Oxford, v. 42, n. 3, p. 225-226, May 1939.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1983. 539 p.

COPING, L. G. **The manual of biocontrol agents: a world compendium**. 3. ed. Croydon: British Crop Protection Council, 2004. 702 p.

CORRAL, L. G.; POST, L. S.; MONTVILLE, T. J. Antimicrobial activity of sodium bicarbonate. **Journal of Food Science**, Champaign, v. 53, n. 3, p. 981-982, May 1988.

DAUGHTREY, M. L.; WICK, R. L.; PETERSON, J. L. **Compendium of flowering potted plant diseases**. Saint Paul: American Phytopathological Society Press, 1995. 90 p.

DAYAN, F. E.; CANTRELL, C. L.; DUKE, S. O. Natural products in crop protection. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 17, n. 12, p. 4022-4342, June 2009.

DORIGHELLO, D. V. **Controle da ferrugem asiática da soja (*Phakopsora pachyrhizi*) com óleo de café e *Bacillus* spp.** 2013. 45 p. Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 2013.

DORIGHELLO, D. V. et al. Controlling Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) with *Bacillus* spp. and coffee oil. **Crop Protection**, Guildford, v. 67, p. 59–65, Jan. 2015.

ELAD, Y. et al. (Ed.). **Botrytis: biology, pathology and control**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2004. 428 p.

ELAD, Y.; MALATHRAKIS, N. E.; DIK, A. J. Biological control of Botrytis-incites diseases and powdery mildews in greenhouse crops. **Crop Protection**, Guildford, v. 15, p. 229-240, 1996.

ELAD, Y.; SHTIENBERG, D. *Botrytis cinerea* in greenhouse vegetables: chemical, cultural, physiological and biological controls and their integration. **Integrated Pest and Management Reviews**, Oxford, v. 1, n. 1, p. 15-29, Mar. 1995.

EMMERT, E. A. B.; HANDELSMAN, J. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 171, n. 1, p. 1-9, Feb. 1999.

ESKES, A. B. The use of leaf disk inoculations in assessing resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*). **Netherlands Journal of Plant Pathology**, Netherlands, v. 88, n. 4, p. 127-141, July 1982.

FALLANJA, F. et al. Salt addiction improves the control of citrus disease using electrolysis with conductivity diamonds eletrodes. **Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 95, n. 2, p. 373-383, 2013.

FOKKEMA, N. J. Opportunities and problems of control of foliar pathogens with micro-organisms. **Pesticide Science**, Tóquio, v. 37, n. 4, p. 411-416, 1993.

FONSECA, M. G. U. et al. Percepção de risco: maneiras de pensar e agir no manejo de agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 11, p. 39-50, jan./mar. 2007.

FRANCO, D. A. S.; BETTIOL, W. Efeito de produtos alternativos para o controle do bolor verde (*Penicillium digitatum*) em pós-colheita de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 569-572, ago. 2002.

FUJINAWA, M. F. et al. Primeiro relato de *Myrothecium* sp. causando mancha foliar em begônia no Brasil. **Tropical Plant Pathology**, Viçosa, v. 37, supl., p. 1, 2012.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. 2. ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2002. 78 p.

GUETSKY, R. et al. Improving biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease suppression. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 92, n. 9, p. 976-985, Sept. 2002.

GULLINO, M. L. Chemical control of *Botrytis* spp. In: INTERNATIONAL BOTRYTIS SYMPOSIUM, 10., 1992, Herakliom. **Proceedings...** Herakliom: [s.n.], 1992. p. 217-222.

GULLINO, M. L.; ALOI, C.; GARIBALDI, A. Influence of sprays schedules on fungicide resistance population of *Botrytis cinerea* Pers on grapevine. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, Netherlands, v. 95, Suppl. 1, p. 87-94, Jan. 1989.

HANG, N. T. T. et al. *Bacillus subtilis* S1-0210 as a biocontrol agent against *Botrytis cinerea* in strawberries. **The Plant Pathology Journal**, Bari, v. 21, n. 1, p. 59-63, Jan. 2005.

HARWOOD, C. R.; WIPAT, A. Sequencing and functional analysis of the genome of *Bacillus subtilis* strain 168. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 389, n. 1, p. 84-87, June 1996.

HOCH, J.; SONENSHEIN, A.; LOSER, A. ***Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria: biochemistry, physiology and molecular genetics**. Washington: American Society for Microbiology, 1996. 1000 p.

HOMMA, Y.; ARIMOTO, Y.; MISATO, T. Effect of sodium bicarbonate on each growth stage cucumber powdery mildew fungus (*Sphaerotheca fuliginea*) in its life cycle. **Journal of Pesticide Science**, Tokyo, v. 6, p. 201-209, 1981.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FLORICULTURA - IBRAFLOR. Disponível em: <<http://www.ibraflor.com/publicacoes/vw.php?cod=189>>. Acesso em: 20 mar. 2013.

INSTITUTO DE ECONOMIA AGRICOLA - IEA. **Comércio exterior da floricultura brasileira em 2010: situação crítica**. São Paulo: IEA, 2013.

Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/LerTexto.php?codTexto=12058>>. Acesso em: 19 fev. 2013.

JARVIS, W. R. Epidemiology. In: COLEY-SMITH, J. R.; VERHOEFF, W. R.; JARVIS, W. R. (Ed.). **The biology of *botrytis***. London: Academic Press, 1980. p. 219-250.

_____. Managing diseases in greenhouse crops. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 73, n. 3, p. 190-194, 1989.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. da S. Análise conjuntural do comércio exterior da floricultura brasileira. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Brasília, v. 16, n. 1, p. 79-81, 2010.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. S. **Exportações de flores e plantas ornamentais superam US\$ 35 milhões em 2007**: recorde e novos desafios para o Brasil. São Paulo: Hórtica Consultoria e Treinamento, 2008. 8 p.

_____. **Perfil da cadeia produtiva das flores e plantas ornamentais do Distrito Federal**. Brasília: SEBRAE, 2005. 121 p.

KARLSSON, M. G.; HEINS, R. D. Begonias. In: LARSON, R. A. (Ed.). **Introduction to floriculture**. 2. ed. New York: Academic Press, 1992. p. 409-428.

KATZ, E.; DEMAIN, A. L. The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions. **Bacterial reviews**, Washington, v. 41, n. 2, p. 449-479, June 1977.

LANGE, A. de; BOUMAN, F. **Seed micromorphology of neotropical Begonias**. Washington: Smithsonian Institution Press, 1999. 49 p.

LARSON, R. A. **Introduction to floriculture**. New York: Academic Press, 1980. 625 p.

LEE, J. P. et al. Evaluation of formulations of *Bacillus licheniformis* for the biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea*. **Biological control**, Dordrecht, v. 37, n. 3, p. 329-337, June 2006.

LEELASUPHAKUL, W.; HEMMANEE, P.; CHUENCHITT, S. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the

green mold pathogen (*Penicillium digitatum*) of citrus fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 48, n. 1, p. 113-121, Apr. 2008.

LIDDEL, H. G. et al. **A geek-english lexicon**. Oxford: Clarendon Press, 1940. 726 p.

LOLLOO, R. et al. A downstream process for production of a viable and stable *Bacillus cereus* aquaculture biological agent. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 86, n. 2, p. 499-508, Mar. 2010.

LOPEZ-HERRERA, C. J.; VERDÚ-VALIENTE, B.; MELERO-VARA, J. M. Eradication of primary inoculum of *Botrytis cinerea* by solarization. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 78, n. 6, p. 594-597. 1994.

MAUDE, R. B. Disease control. In: COLEY-SMITH, J. R.; VERHOEFF, K.; JARVIS, W. R. (Ed.). **The biology of Botrytis**. London: Academic Press, 1980. p. 275-308.

MATTOS, L. P. V. **Controle de Guignardia citricarpa e Penicillium digitatum em laranja com óleos essenciais e agentes de biocontrole**. 2010. 104 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

MAZZINI, F. Come cambiano le norme sui prodotti fitosanitari e loro coadiuvanti. **Informatore Fitopatológico**, Italy, v. 52, p. 42-46, 2002.

MÉDICE, R. et al. Óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 1, p. 83-90, jan./fev. 2007.

MÉDICE, R. **O efeito de produtos alternativos no controle de oídio e Bacillus spp. como promotores de crescimento da soja**. 2011. 90 p. Tese (Doutorado em Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 2011.

MEJIAS, R. J.; RUANO, M. C. **El cultivo industrial de plantas en macetas**. Reus: Ediciones de Horticultura, 1990. 664 p.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Agrofit**, Brasília, 2013. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 03 jun. 2013.

MONTVILLE, T. J.; SHIH, P. L. Inhibition of mycotoxigenic fungi in corn by ammonium and sodium bicarbonate. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 54, n. 4, p. 295-297, Apr. 1991.

MORANDI, M. A. B. **A influência de fatores bióticos e abióticos no estabelecimento de *Clonostachys rosea* em tecido de roseira e controle biológico de *Botrytis cinerea* pelo antagonista em restos culturais**. 2001. 71 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.

MORANDI, M. A. B. et al. Suppression of *Botrytis cinerea* sporulation by *Clonostachys rosea* on rose debris: a valuable component in *Botrytis* blight management in commercial greenhouses. **Biological Control**, Orlando, v. 26, n. 3, p. 311-317, Mar. 2003.

MORANDI, M. A. B.; SUTTON, J. C.; MAFIA, L. A. Effects of host and microbial factors on development of *Clonostachys rosea* on control of *Botrytis cinerea* in rose. **European Journal of Plant Pathology**, Oxford, v. 106, n. 5, p. 439-448, June 2000.

NAKKANO, M. M.; HULLET, F. M. Adaptation of *Bacillus subtilis* of oxygen limitation. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 157, n. 1, p. 1-7, Dec. 1997.

PALMER, C. L.; HORST, R. K.; LANGHANS, R. W. Use of bicarbonates to inhibit *in vitro* colony growth of *Botrytis cinerea*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, n. 12, p. 1432-1438, Dec. 1997.

PAULA JUNIOR, T. J. de et al. Controle alternativo de doenças de plantas: histórico. In: VENEZON, M.; PAULA JUNIOR, T. J. de; PALLINI, A. (Ed.). **Controle alternativo de pragas e doenças**. Viçosa: Epamig, 2005. p. 135-162.

PENG, G.; SUTTON, J. C. Evaluation of microorganisms for biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v. 13, n. 3, p. 247-257, Dec. 1991.

PEREIRA, R. B. et al. Extrato de casca de café, óleo essencial de tomilho e acibenzolar-S- metil no manejo da cercosporiose-do-cafeeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 10, p. 1287-1296, out. 2008.

PERO, J.; SLOMA, A. Proteases. In: SONENSHEIN, A. L.; HOCH, J. A.; LOSICK, R. (Ed.). **Bacillus subtilis and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics**. Washington: American Society for Microbiology, 1993. p. 939-952.

PIGGOT, P.; HILBERT, D. Sporulation of *Bacillus subtilis*. **Current Opinion on Microbiology**, London, v. 7, n. 6, p. 579-586, Dec. 2004.

REETZ, E. R. **Anuário brasileiro das flores 2007**. Santa Cruz do Sul: Gazeta Santa Cruz, 2007. 112 p.

REYNOLDS, D.; DEVRIES, D.; CARNEY, L. Begonia. In: BALL, V. (Ed.). **Ball red book**. Batavia: Ball Publishing, 1998. p. 388-395.

ROMEIRO, R. da S. Doenças de plantas e biocontrole: uma opção inteligente. In: VENEZON, M.; PAULA JUNIOR, T. J. de.; PALLINI, A. (Ed.). **Controle alternativo de pragas e doenças**. Viçosa: Epamig, 2005. p. 295-330.

SAITO, M. L.; SCRAMIN, S. **Plantas aromáticas e seu uso na agricultura**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 46 p. (Documentos, 20).

SANTOS, R. H. S.; MENDONÇA, E. S. Agricultura natural, orgânica, biodinâmica agroecologia. **Informe Agropecuário**, São Paulo, v. 22, p. 5-8, 2001.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 2004. p. 403-434.

SCHROERS, H. J. et al. *Fusarium foetens*, a new species pathogenic to *Begonia elatior* hybrids (*Begonia hiemalis*) and the sister taxon of the *Fusarium oxysporum* species complex. **Mycologia**, Lancaster, v. 96, n. 2, p. 393-406, mar./abr. 2004.

SEABROOK, P.; ROCHFORD, T. C. **Plants for your home**. Nottingham: Editions Floraisse, 1974.

SILVEIRA, R. B. de A. Floricultura no Brasil. **Horticultura Ornamental**, São Paulo, 2013. Disponível em: <<http://www.uesb.br/flower/florbrasil.html>>. Acesso em: 19 fev. 2013.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFRG, 1999. p. 387-415.

SMILANICK, J. L. et al. Control of citrus green mold by carbonate and bicarbonate salts and the influence of commercial postharvest practices on their efficacy. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 83, n. 2, p. 139-145, Feb. 1999.

SPADARO, D.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M. L. Control of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* on apple combining a biocontrol agent with hot water dipping and Acibenzolar-S-methyl, baking soda, or ethanol application. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 33, n. 2, p. 141-151, Aug. 2004.

SUTTON, J. C. et al. *Gliocladium roseum*: a versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, n. 4, p. 316-328, Apr. 1997.

THAKORE, Y. The biopesticide market for global agricultural use. **Industrial Biotechnology**, Swansea, v. 2, n. 3, p. 194-208, Oct. 2006.

TIMUDO-TORREVILLA, O. E. et al. Present status of strawberry fruit rot diseases in New Zealand. **New Zealand Plant Protection Society**, Nova Zelândia, v. 58, p. 74-79, Jan. 2005.

TOURÉ, R. et al. Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 95, n. 5, p. 1058-1069, 2003.

TRIPATHI, P.; DUBEY, N. K.; SHUKLA, A. K. Use of some essential oils as post-harvest botanical fungicides in the management of grey mould of grapes caused by *Botrytis cinerea*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Netherlands, v. 24, n. 1, p. 39-46, Jan. 2008.

WARRIOR, P.; KONDURU, K.; VASUDEVAN, P. Formulation of biological control agents for pest and disease management. In: GNANAMANICKAM, S. S. (Ed.). **Biological control of crop diseases**. New York: Marcel Dekker, 2002. p. 421-441.

WILLIAMSON, B. et al. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 8, n. 5, p. 561-580, Sept. 2007.

WILSON, C. L. Biological control and plant diseases: a new paradigm. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 19, p. 158-159, 1997.

YOON, C. S. et al. Survey of fungicide resistance for chemical control of *Botrytis cinerea* on paprika. **The Plant Pathology Journal**, Korea, v. 24, n. 4, p. 447-452, Dec. 2008.

ZAMBONELLI, A. et al. Effects of essential oils on phytopathogenic fungi in vitro. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 144, n. 9/10, p. 491-494, Nov. 1996.

ZIV, O.; ZITTER, T. Effects of bicarbonates and film-forming polymers on cucurbit foliar diseases. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 76, n. 5, p. 513-517, Jan. 1992.