



**EFEITO DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA-B SOBRE A GERMINAÇÃO
DE CONÍDIOS DE *Botrytis cinerea* E COLONIZAÇÃO EM DISCOS DE
MORANGO**

THAIS H.B. SILVA¹; WAGNER BETTIOL²; LÚCIO B. COSTA³; MARCELO A.B.
MORANDI⁴

Nº 12410

RESUMO

O ultravioleta é um fator de grande impacto na agricultura e está intimamente relacionado à camada de ozônio, a qual vem sendo reduzida paulatinamente, em consequência das atividades antrópicas. A camada de ozônio está sendo degradada, principalmente, por ação dos clorofluorcarbonos (CFC) utilizados pelo homem alterando assim a intensidade de radiação ultravioleta na superfície terrestre em especial no comprimento de onda da radiação ultravioleta B (UV-B). O objetivo do trabalho foi avaliar a resistência de conídios de *Botrytis cinerea* à radiação UV-B. Foram testados 13 isolados do patógeno, onde uma suspensão contendo 10^5 conídios mL^{-1} de cada isolado foi preparada e uma alíquota de 20 μL foi colocada no centro de uma placa de Petri contendo BDA. Os conídios foram expostos à radiação UV-B 5,6 kJ m^{-2} a uma irradiância de 823 mW m^{-2} . Também foi avaliada a esporulação de *B. cinerea* em discos de folha de morangueiro em meio de cultura paraquat-clorofenicol-água (PCA). Os isolados apresentaram germinação relativa entre 15% e 90%, sendo que os isolados com maior resistência à radiação UV-B foram o LQC 162, LQC 150 e LQC 159. No teste da esporulação foi observado maior diferenças entre os isolados quanto a formação de conidióforos do patógeno sendo os isolados LQC 150 e LQC 157 superiores aos outros isolados. Foi selecionado o isolado LQC 150 para ensaios posteriores onde será comparada a tolerância desse isolado com isolados de agentes de controle biológico deste patógeno quanto a tolerância a radiação UV-B.

ABSTRACT

¹ Bolsista do CNPQ: Graduação em Ciências Biológicas, UNIPINHAL, Espírito Sto do Pinhal-SP, e-mail: thaisbenassi@gmail.com

² Orientador, pesquisador Embrapa Meio Ambiente, CP 69, 13820-000 Jaguariúna, SP, Brasil.

³ Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP) Campus Botucatu, CEP 18.610-307 - Botucatu, SP, Brasil

⁴ Colaborador, pesquisador Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP, Brasil.



The ultraviolet is a great factor of impact on agriculture and is closely related to the ozone layer, which has been gradually reduced as a result of human activities. The ozone layer are degraded mainly by the action of chlorofluorocarbons (CFC) used by man thus altering the intensity of ultraviolet radiation on the surface in particular wavelengths of ultraviolet B radiation (UV-B). The objective of this study was to evaluate the resistance of *Botrytis cinerea* conidia to UV-B. It were tested 13 isolates of the pathogen, in which a conidia suspension containing 10^5 conidia mL^{-1} of each isolate was prepared and an aliquot of 20 μL was placed in the center of a Petri dish containing PDA. Conidia were exposed to UV-B 5.6 kJ m^{-2} and an irradiance of 823 mW m^{-2} . We also analyzed the sporulation of *B. cinerea* on strawberry leaf discs in culture medium paraquat-clorofenicol-agar (PCA). The isolates presented germination of 15% to 90%, and those presented greater resistance to UV-B were LQC 162, LQC 150 and LQC 159. In the sporulation test differences were observed between the isolates regarding the formation of the conidiophores of the pathogen, and the isolates LQC 150 and LQC 157 were superior to the other isolates. We selected the isolate LQC 150 for subsequent tests which will be compared the tolerance of this isolate with those strains of biological control agents of this pathogen regarding its tolerance to UV-B radiation.

INTRODUÇÃO

A camada de ozônio está sendo reduzida, paulatinamente, em consequência das atividades antrópicas. Alguns cientistas acreditam que essa perda ocorreu de 4 a 6% entre os anos de 1979 a 1999, nos países do hemisfério norte (HOLLANDSWORTH et al., 1995). A camada de ozônio está sendo degradada, principalmente, por ação dos clorofluorcarbonos (CFC) utilizados pelo homem (IPCC, 2007).

Com a intenção de mitigar o efeito sobre a camada de ozônio foi elaborado o Protocolo de Montreal que visa à redução gradual e/ou substituição do gás CFC por outros gases não nocivos ao ozônio. Mesmo assim, pesquisadores afirmam que os níveis de ozônio irão subir novamente apenas a partir do meio do século 21 (HADER et al., 2003), fazendo com que os habitantes da Terra sofram com o efeito da redução da sua camada de ozônio por algumas décadas (MCKENZIE et al., 2007; GODIN-BEEKMANN, 2010). Entre as principais consequências dessa destruição, pode-se citar a ação direta de raios solares sobre a superfície terrestre, em especial, dos raios ultravioletas.

O ultravioleta é um fator de grande impacto na agricultura e está intimamente relacionado à camada de ozônio. O ozônio na estratosfera (entre 12 a 50 km da superfície do planeta) serve como importante filtro de radiações solares, sendo o ultravioleta a principal radiação filtrada pela camada de ozônio (GODIN-BEEKMANN, 2010). A radiação ultravioleta pode ser convencionalmente, dividida de acordo com o seu comprimento de onda em: a) radiação UV-C (100 a 280 nm) que não apresenta risco para a Terra, porque é absorvida por outros gases, como por exemplo, o oxigênio (KULUNCSICS et al., 1999); b) radiação UV-B (280 a 315 nm) que é filtrada pela camada de ozônio e tem grande efetividade biológica quando comparada às outras radiações do ultravioleta, sendo hoje preocupação até na saúde humana (TSAI et al., 2009); e c) radiação UV-A (315 a 400 nm) que não é absorvida pela camada de ozônio e apresenta incidência direta sobre a Terra (PAUL, 2000).

Indiscutivelmente, a radiação solar é um fator que interfere durante a aplicação de um agente de controle biológico a campo (BRAGA et al., 2001; MORANDI et al., 2006). As radiações UV-A e UV-B podem inativar propágulos dos agentes de biocontrole em poucas horas, em decorrência de mudanças genéticas e morfológicas, resultando em perda da eficiência do agente de biocontrole (BRAGA et al., 2001).

Com isso o objetivo do ensaio foi avaliar a sensibilidade de conídios de 13 isolados de *Botrytis cinerea* a radiação UV-B e também quantificar se existe diferença na capacidade de esporulação desses isolados em disco de folha e assim futuramente comparar com a sensibilidade de esporos de agente de controle biológico como *Trichoderma* sp. e *Clonostachys rosea* e com isso sugerir que o aumento da intensidade da radiação ultravioleta irá interferir na capacidade de antagonismo desses fungos ao patógeno.

MATERIAL E MÉTODOS

Efeito da radiação UV-B sobre a germinação de *B. cinerea*

A câmara de radiação UV-B era composta por 4 lâmpadas fluorescentes (Q-lab Cleveland, OH, USA) onde cada lâmpada foi coberta com um filtro de diacetato de celulose de 0,13 mm, que permite a passagem do UV-B, mas bloqueia a radiação UV-C (<280 nm) e espectros do UV-B que não atingem a superfície terrestre (<290 nm). Placas não irradiadas eram cobertas com papel alumínio para proteção física dos conídios. As placas foram mantidas a uma irradiância de 823 mW m⁻² (Figura 1A) sobre três diferentes doses 5,96; 8,94 e 11,92 kJ m⁻² de radiação UV-B, a irradiação foi

calculada com a ajuda de um espectroradiômetro (Ocean Optics modelo USB2000 + rad). O espectro de ação de dano do DNA foi desenvolvido e normalizado por Quate et al. (1992) para calcular as irradiâncias UV-B (mW m^{-2}). Para homogeneizar as dosagens no interior da câmara as placas foram casualizadas em intervalos de 30 minutos.

Uma suspensão de conídios de *B. cinerea* (LQC 161) na concentração 10^5 conídios ml^{-1} foi preparada, a partir de cada um dos isolados, alíquotas de 20 μL das suspensões foram depositadas no centro de placas de Petri contendo meio BDA. As placas foram imediatamente colocadas no interior da câmara de UV-B. Foi avaliada a germinação de conídios de cada isolado.

A germinação dos conídios foi avaliada utilizando um microscópio ótico com aumento de 400 vezes. A germinação foi avaliada após 12, 24 e 36 horas após a inoculação. Porcentagem de germinação relativa por cada período de incubação foi calculada pela equação: Germinação relativa (%) = $(Gt/Gc) \times 100$; onde Gt é o número de conídios germinados de cada replicata expostas por um período de tempo t e Gc é o número de conídios germinados nas placas testemunhas (BRAGA et al., 2001).

A partir desse ensaio foi calculada a dose letal cinquenta (DL_{50}) para cada intervalo de tempo onde o melhor resultado foi utilizado nos ensaios subsequentes. O ensaio foi repetido por três vezes e cada repetição teve duas placas como replicatas.

Teste de seleção de isolados de *Botrytis cinerea* a radiação UV-B

Foram utilizados 13 isolados de *B. cinerea* coletados de plantas de morangueiro de diferentes partes do estado de São Paulo (Tabela 1). Para avaliar o efeito sobre a germinação foi utilizado a metodologia como descrita anteriormente, no entanto, cada isolado foi exposto a uma única dose $6,9 \text{ kJ m}^{-2}$ de radiação UV-B (previamente selecionado). A germinação foi avaliada 12 horas para as placas testemunha e 24 horas após à inoculação para as placas irradiadas. O ensaio foi repetido por três vezes e cada repetição teve duas placas como replicatas.

TABELA 1. Origem dos isolados de *Botrytis cinerea* utilizados nos ensaios.

Isolados de <i>Botrytis cinerea</i> coletados de morangueiro				
Isolados	Instituição	Origem de coleta	Isolado em	Data no laboratório
LQC 150	UFV	Serra Negra	Morango	10/03/2011
LQC 151	UFV	Serra Negra	Morango	10/03/2011
LQC 152	UFV	Serra Negra	Morango	10/03/2011
LQC 153	UFV	Serra Negra	Morango	10/03/2011
LQC 154	UFV	Serra Negra	Morango	10/03/2011
LQC 155	UFV	Serra Negra	Morango	10/03/2011
LQC 156	UFV	Serra Negra	Morango	10/03/2011
LQC 157	UFV	Serra Negra	Morango	10/03/2011
LQC 158	UFV	Serra Negra	Morango	10/03/2011
LQC 159	UFV	Serra Negra	Morango	10/03/2011
LQC 160	UFV	Serra Negra	Morango	10/03/2011
LQC 161	UFV	Serra Negra	Morango	10/03/2011
LQC 162	EMBRAPA	Serra Negra	Morango	15/06/2010
LQC 163	EMBRAPA	Atibaia	Morango	10/02/2011

Teste de esporulação de *Botrytis cinerea* em discos de folha de morangueiro

Os mesmos isolados foram testados também quanto à capacidade de esporulação em discos de folha de morangueiro. Para este ensaio foi utilizada a metodologia proposta por Morandi et al. (2000) alterada, na qual discos de folha de morangueiro (cv Camarosa, entre 30 a 60 dias de idade) de 1 cm de diâmetro foram desinfestados superficialmente (1 min. álcool 70%, 1 min. em hipoclorito de sódio 1% e lavados em água destilada esterilizada em abundância) e, posteriormente, secos no interior de câmara de fluxo laminar. Depois de secos, os discos foram dispostos em placas (10 discos por placa) de Petri descartáveis (10 × 100 cm) sobre papel absorvente umedecido (5 ml de água esterilizada). Após esse processo cada disco recebeu uma alíquota de 20 µl da suspensão de conídios a 10⁵ conídios ml⁻¹ do patógeno. Após a inoculação os discos foram transferidos para o meio PCA.

As placas foram mantidas em BOD a 22°C por 10 dias sendo os discos avaliados no terceiro, sétimo e décimo dia após inoculação. A avaliação foi realizada seguindo o método Peng e Sutton (1991) onde notas foram dadas e é calculada a área foliar com conidióforos do patógeno, as escalas de notas foram: 0 = 0% (0%), 1 = 2% (1–3%), 2 = 5% (4–6%), 3 = 10% (7–12%), 4 = 20% (13–26%), 5 = 40% (27–53%), 6 = 65% (54–76%) e 7 = 90% (77–100%). O ensaio foi repetido por três vezes e cada repetição teve três placas como replicatas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito da radiação UV-B sobre a germinação de *B. cinerea*

Os conídios não irradiados apresentaram germinação próxima a 100% logo após 12 horas de inoculação ao passo que os conídios submetidos à radiação UV-B sofreram atraso na germinação apresentando alguma germinação apenas após 24 horas de incubação e quanto maior a dose de radiação UV-B consequentemente aumentou a porcentagem de conídios não germinados (Figura 1B). A dose de 5,6 kJ m⁻² apresentou germinação superior a 80% após 36 horas de incubação. As doses de 8,4 e 11,2 kJ m⁻² apresentaram germinação inferior a 20%. Com a análise de regressão foi decidido trabalhar com a doses 6,8 kJ m⁻² para o ensaio de seleção de isolados de *B. cinerea*.

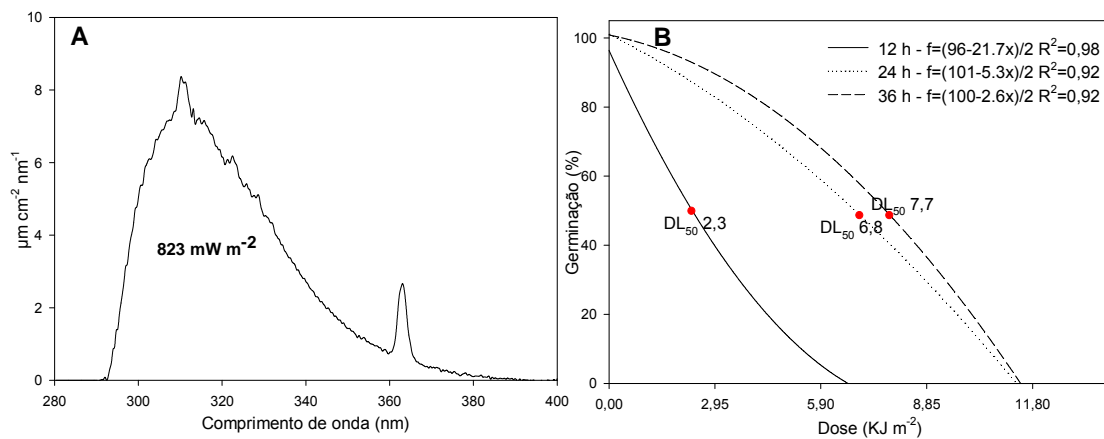


FIGURA 1A. Irradiância média no interior da câmara de UV-B. A câmara de UV-B provinha radiação UV-B de 823 mW m^{-2} a altura de 18 cm das lâmpadas. **1B.** Efeito de três diferentes doses de radiação UV-B (5,6; 8,4 e 11,2 kJ m^{-2}) sobre a germinação de conídios de *Botrytis cinerea* (LQC 162).

Teste de seleção de isolados de *Botrytis cinerea* a radiação UV-B

O isolado LQC 162 apresentou melhor média na germinação relativa, entretanto esse isolado não diferiu significativamente entre os isolados LQC 150, LQC 159, LQC 157, LQC 156, LQC 161, LQC 151, LQC 163, LQC 158, LQC 160 e LQC 155 (Figura 2). Apenas os isolados LQC 154 e LQC 153 foram significativamente inferior (Tukey 5%) quanto à tolerância a radiação UV-B apresentando germinação relativa inferior a 20%.

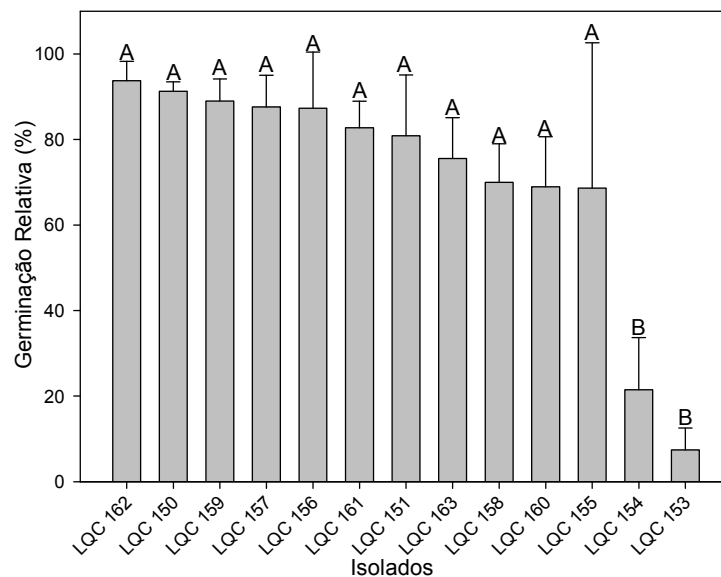


FIGURA 2. Germinação relativa dos isolados de *Botrytis cinerea* submetidos à radiação UV-B 6,9 kJ m⁻². A germinação relativa foi calculada em relação às placas não irradiadas. Barras com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância ($p < 0,001$).

Teste de esporulação de *Botrytis cinerea* em discos de folha de morangueiro

No teste de esporulação do patógeno em discos de folha a área abaixo da curva de progresso da incidência *B. cinerea* nos discos foi bastante uniforme entre os isolados durante todo o ensaio apenas os isolados LQC 155, LQC 159 e LQC 158 apresentaram incidência significativamente inferior aos outros tratamentos pelo teste de Tukey a 5% (Figura 3A).

Já a área abaixo da curva de progresso da esporulação mostrou grande diferença na formação de conidióforos entre os diferentes isolados, destaque apenas para os isolados LQC 150 e LQC 157 por apresentarem maior quantidade de conidióforos formados por disco de folha. Todos os outros 11 isolados foram significativamente inferior na quanto a esporulação por disco (Figura 3B).

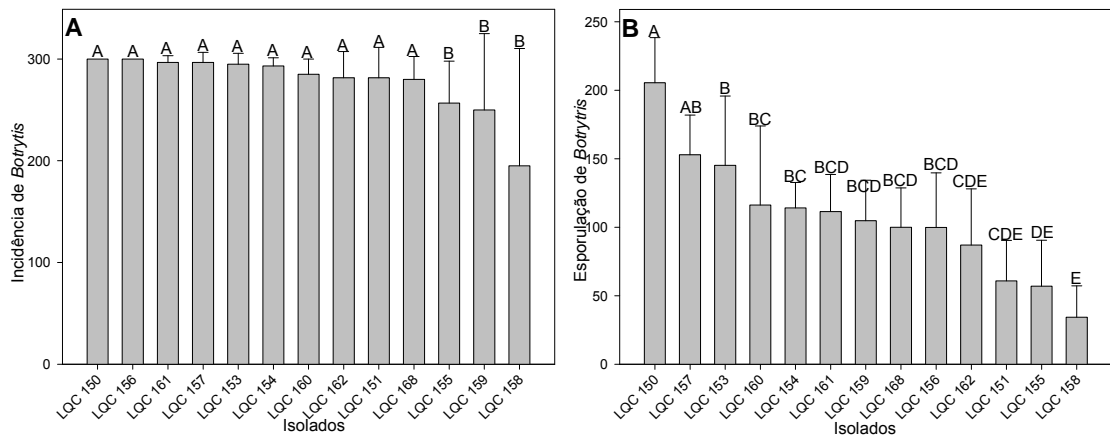


FIGURA 3A. Área abaixo da curva do progresso da incidência de diferentes isolados de *Botrytis cinerea* em discos de folha de morangueiro. **3B.** Área abaixo da curva do progresso da esporulação de diferentes isolados de *Botrytis cinerea* em discos de folha de morangueiro. Barras com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância ($p < 0,001$).

CONCLUSÃO

Os isolados de *Botrytis cinerea* apresentam pouca variabilidade de tolerância a radiação UV-B, talvez porque a maioria dos isolados seja de uma mesma região (Figura 1).

No entanto, no teste de esporulação em discos de folha apresentou melhor variabilidade de resultados sendo que o isolado LQC 150 selecionado para testes futuros com agentes de controle biológico porque este apresenta boa tolerância a radiação UV-B e apresenta boa capacidade de esporulação e formação de conidióforos em tecido do hospedeiro.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ pela concessão de bolsa na modalidade Iniciação Científica da primeira autora.



REFERÊNCIAS

- BRAGA, G.U.L.; FLINT, S.D.; MESSIAS, C.L.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Effects of UVB irradiance on conidia and germinants of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*: A study of reciprocity and recovery. **Photochemistry and Photobiology**, v. 73, n. 2, p. 140-146, 2001.
- GODIN-BEEKMANN, S. Spatial observation of the ozone layer. **Comptes Rendus Geoscience**, v. 342, n. 4-5, p. 339-348, 2010.
- HADER, D.P.; KUMAR, H.D.; SMITH, R.C.; WORREST, R.C. Aquatic ecosystems: effects of solar ultraviolet radiation and interactions with other climatic change factors. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 2, n. 1, p. 39-50, 2003.
- HOLLANDSWORTH, S.M.; MCPETERS, R.D.; FLYNN, L.E.; PLANET, W.; MILLER, A.J.; CHANDRA, S. Ozone trends deduced from combined nimbus-7 sbuv and noaa-11 sbuv/2 data. **Geophysical Research Letters**, v. 22, n. 8, p. 905-908, 1995.
- IPCC. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. In: R.K., P. e A., R. (Ed.). **Climate Change 2007: Synthesis Report**. Cambridge University Press. Geneva, 2007. p.104.
- KULUNCSICS, Z.; PERDIZ, D.; BRULAY, E.; MUEL, B.; SAGE, E. Wavelength dependence of ultraviolet-induced DNA damage distribution: involvement of direct or indirect mechanisms and possible artefacts. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 49, n. 1, p. 71-80, 1999.
- MCKENZIE, R.L.; AUCAMP, P.J.; BAIS, A.F.; BJORN, L.O.; ILYAS, M. Changes in biologically-active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 6, n. 3, p. 218-231, 2007.
- MORANDI, M.A.B.; MAFFIA, L.A.; MIZUBUTI, E.S.G.; ALFENAS, A.C.; BARBOSA, J.G.; CRUZ, C.D. Relationships of microclimatic variables to colonization of rose debris by *Botrytis cinerea* and the biocontrol agent *Clonostachys rosea*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 16, n. 6, p. 619-630, 2006.
- MORANDI, M. A. B.; SUTTON, J. C.; MAFFIA, L. A. Effects of host and microbial factors on development of *Clonostachys rosea* and control of *Botrytis cinerea* in rose. **European Journal of Plant Pathology**, v. 106, n. 5, p. 439-448, 2000.
- PAUL, N. D. Stratospheric ozone depletion, UV-B radiation and crop disease. **Environmental Pollution**, v. 108, n. 3, p. 343-355, 2000.
- PENG, G.; SUTTON, J. C. Evaluation of microorganisms for biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry. **Canadian Journal of Plant Pathology-Revue Canadienne de Phytopathologie**, v. 13, n. 3, p. 247-257, Sep 1991.
- QUAITE, F. E.; SUTHERLAND, B. M.; SUTHERLAND, J. C. Action spectrum for DNA damage in alfalfa lowers predicted impact of ozone depletion. **Nature**, v. 358, n. 6387, p. 576-578, 1992.
- TSAI, M. L.; CHANG, K. Y.; CHIANG, C. S.; SHU, W. Y.; WENG, T. C.; CHEN, C. R.; HUANG, C. L.; LIN, H. K.; HSU, I. C. UVB Radiation Induces Persistent Activation of Ribosome and Oxidative Phosphorylation Pathways. **Radiation Research**, v. 171, n. 6, p. 716-724, 2009.



6º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica - CIIC 2012
13 a 15 de agosto de 2012 – Jaguariúna, SP
