



**EFEITO DA RADIAÇÃO UV-B SOBRE A CAPACIDADE ANTAGÔNICA DE *Clonostachys rosea* A *Botrytis cinerea* EM DISCOS DE FOLHA DE MORANGO**

**LÚCIO B. COSTA<sup>1</sup>, WAGNER BETTIOL<sup>2</sup>, MARCELO A.B. MORANDI<sup>2</sup>,  
DRAUZIO E.N. RANGEL<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Doutorando, UNESP/Botucatu, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP, lucio@cnpma.embrapa.br

<sup>2</sup> Pesquisador, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP, bettiol@cnpma.embrapa.br

<sup>3</sup> Pesquisador, UNIVAP, São José dos Campos-SP, drauzio@univap.br

**RESUMO:** As atividades antrópicas estão alterando a concentração de gases na atmosfera, o ozônio da troposfera é um dos afetados e conseqüentemente a incidência de raios ultravioleta B (UV-B) na superfície da Terra tem sido alterada. A sensibilidade à radiação UV-B é uma das limitações do uso de agentes de biocontrole a campo. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da radiação UV-B em um isolado de *Clonostachys rosea* e quantificar a capacidade antagônica a *Botrytis cinerea* em discos de folhas de morango. Foram utilizadas quatro concentrações de conídios de *C. rosea* e quatro diferentes doses de radiação UV-B, sendo metade dos discos irradiados desafiados com conídios de *B. cinerea*. As concentrações de conídios de *C. rosea* acima de  $10^5$  conídios mL<sup>-1</sup> apresentaram maior tolerância a radiação UV-B e apresentou nível de controle do patógeno superior a 75%, mesmo com a exposição à radiação. De acordo com os resultados, além de mostrar menor crescimento sob radiação UV-B, conídios de *C. rosea* apresentaram menor capacidade antagônica ao patógeno. Estudos adicionais são necessários para observar a tolerância de isolados de *B. cinerea* à radiação UV-B e assim, sugerir que um ambiente com radiação UV-B aumentada possa favorecer o patógeno.

**PALAVRAS-CHAVE:** mudanças climáticas, *Gliocladium roseum*, ultravioleta - B, mofo-cinzento.

## INTRODUÇÃO

*Botrytis cinerea* é um fungo necrotrófico cosmopolita capaz de atacar mais de 200 gêneros de plantas (JARVIS, 1989). O patógeno causa o mofo-cinzento, uma das doenças mais destrutivas em cultivo protegido. Culturas como morango, rosa, tomate, crisântemo e eucalipto são afetadas em condições de casa de vegetação. (GULLINO; ALOI; GARIBALDI, 1989). O fungo causa perdas superiores a 50 % em morango (BLANCO, DE LOS SANTOS; ROMERO, 2006). Todas as partes da planta são suscetíveis incluindo caules, folhas, flores e frutas (SUTTON, 1990). Além dessas plantas, diversas ornamentais produzidas em cultivo protegido são atacadas pelo patógeno.

Por muitos anos, o controle do mofo-cinzento do morango teve sucesso exclusivamente com a utilização de fungicidas durante o florescimento da cultura (MERTELY; MACKENZIE; LEGARD 2002). Entretanto, devido aos diversos problemas relacionados com resistência do patógeno e contaminação dos frutos, o controle biológico passou a ser estudado e implementado pelos agricultores.

*Clonostachys rosea* é comumente encontrado no solo ou sobre restos culturais (SUTTON; PENG, 1993). De acordo com Peng e Sutton (1991), isolados de *C. rosea* suprimiram acima de 98% a esporulação do mofo-cinzento em casa de vegetação apresentando eficácia igual ou superior aos fungicidas. A competição por nutrientes e substratos é o principal mecanismo utilizado por *C. rosea* contra *B. cinerea*, o qual requer açúcares externos para causar infecção no hospedeiro (SUTTON et al., 1997). Embora eficaz contra mofo cinzento, *C. rosea* é suscetível à radiação ultravioleta e apresenta reduzida capacidade antagônica sobre condições de radiação solar (MORANDI et al., 2006; COSTA, 2011). Indiscutivelmente, a radiação solar é um dos fatores que interferem na aplicação de agentes de controle biológico a campo (BRAGA et al., 2001; MORANDI et al., 2006). A radiação UV-A e UV-B podem inativar propágulos dos agentes de controle biológico em poucas horas, devido a alterações genéticas e morfológicas nos conídios (RANGEL et al., 2006).

Poucos trabalhos têm estudado o efeito da radiação UV-B sobre agentes de biocontrole de patógenos de plantas, como *C. rosea* (MORANDI et al., 2008; COSTA, 2011). Considerando o crescente mercado desse antagonista no Brasil, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de um isolado de *C. rosea*, previamente selecionados por apresentar tolerância à radiação UV-B, no controle de *B. cinerea* em discos de folhas de morango em condições controladas.

## MATERIAL E MÉTODOS

Isolados e preparo de inóculo. *Clonostachys rosea* LQC 62, previamente selecionado por apresentar boa tolerância a radiação UV-B (COSTA, 2011), e *B. cinerea* LQC 126, isolado de culturas de morango do Estado de São Paulo, Brasil (altitude: 925 m; latitude: 22° 36' S; longitude: 46° 42' W), foram utilizados no estudo. Os isolados foram depositados na coleção de culturas da Embrapa Meio Ambiente. Os isolados foram cultivados em batata-dextrose-ágar (BDA) (Acumedia/Michigan) contidos em placas de Petri (poliestireno, 90 x 10 mm, Pleion) e incubados a  $25 \pm 2^\circ \text{C}$  e 12 h luz/12 h escuro durante 21 dias. Os conídios foram suspensos em água destilada + Tween 80 (0,01% v/v), posteriormente, uma alíquota de conídios foi uniformizada vigorosamente em agitador de tubo e filtrada em uma membrana de policarbonato (80 mm de diâmetro, 8  $\mu\text{m}$  por poro, Whatman Nucleopore, Clifton, NJ, EUA) para remover agregados de esporos. As concentrações de conídios foram estimadas por contagem em hemocítômetro e as diluições foram feitas com água estéril + Tween para uso imediato nos estudos de irradiação.

Câmara de irradiação, lâmpadas e filtros. Os estudos com irradiação foram conduzidas no interior de uma câmara de UV-B com temperatura controlada, contendo quatro lâmpadas UV-B 313EL (Q-laboratório Cleveland, OH). Cada lâmpada foi coberta com um filtro de diacetato de celulose com espessura de 0,13 mm (Málaga Ltda), que bloqueia radiações  $< 290 \text{ nm}$ . Isto permite a passagem de UV-B e UV-A (290 - 400 nm), mas impede a exposição ao UV-C ( $< 280 \text{ nm}$ ) e espectros de radiação UV-B que não chegam à superfície terrestre de ( $< 290 \text{ nm}$ ). O espectro de ação de dano ao DNA utilizado foi desenvolvido por (QUAITE et al., 1992) e normalizada para a unidade a 300 nm sendo usada para calcular as irradiâncias UV ponderadas ( $\text{mW m}^{-2}$ ). Todas as medições de radiação foram feitas com um espectroradiômetro (Ocean Optics modelo USB2000 + rad) ligado a um computador portátil.

O crescimento de *C. rosea* sobre discos de folhas de morango foi avaliado indiretamente através da quantificação do potencial do fungo em desenvolver sobre a superfície de discos foliares e esporular (MORANDI et al., 2000). Discos de folha de morangueiro com idade entre 30 a 60 dias (cv. Camarosa) com 1 cm de diâmetro foram desinfestadas em álcool 70% (1 min), seguido de hipoclorito de sódio a 2% (1 min) e lavadas três vezes em água destilada esterilizada. Esses discos foram colocados em placas de Petri (90 x 10 mm, Pleion) sobre papel estéril umidificado (5 mL de água esterilizada). Subsequentemente, cada disco recebeu uma alíquota de 20  $\mu\text{L}$  de suspensão de *C. rosea* 0,  $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  sendo o material exposto a radiação UV-B (irradiância  $600 \text{ mW m}^{-2}$ ) (COSTA, 2011) por 0, 1, 2 e 3 h, correspondendo às doses de 0, 2,1; 4,2 e 6,3  $\text{kJ m}^{-2}$ . Placas dos tratamentos testemunhas foram colocadas no interior da câmara embrulhadas em papel alumínio para proteção física contra a radiação. As placas de Petri foram distribuídas aleatoriamente, sendo em intervalos de 30 minutos casualizadas para homogeneizar as doses de radiação UV-B recebidas. Após, os discos foram transferidas para o meio de Paraquat-Chloranfenicol-Ágar (PCA) sobre placas de Petri (PENG; SUTTON, 1991), cada uma contendo dez discos. As placas foram mantidas a  $25 \pm 2^\circ \text{C}$  (12 h luz/12 h escuro) sendo avaliadas 3, 7 e 10 após dias a irradiação. A esporulação de *C. rosea* foi estimada de acordo com a formação de conidióforos sobre o tecido de folha A avaliação foi realizada seguindo uma escala de notas para a área dos discos cobertas com conidióforos do *C. rosea*, onde: 0 = 0% (0%); 1 = 2% (1-3%); 2 = 5% (4-6%); 3 = 10% (7-13%); 4 = 20% (14-27%); 5 = 40% (28-52%); 6 = 70% (53-87%); e 7 = 94% (88-100%) (MORANDI et al., 2000). Todas as avaliações foram feitas com auxílio de um microscópio estereoscópico. Metade dos discos tratados com *C. rosea* e irradiada com radiação UV-B recebeu uma alíquota de *B. cinerea* (10  $\mu\text{L}$  a  $10^5$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ ). O crescimento e esporulação do patógeno foram estimados nos mesmos dias que *C. rosea*. O tratamento controle foi *B. cinerea* inoculado em discos de folhas sem *C. rosea* e não tratadas com radiação UV-B. A avaliação foi realizada após uma escala de notas para a área dos discos cobertos com conidióforos de *B. cinerea*,

como segue: 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%) (PENG; SUTTON, 1991).

Delineamento experimental e análise de dados. Cada experimento foi realizado três vezes com delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Para avaliações em discos de folhas, cada placa continha 10 discos. Os dados foram agrupados para as análises estatísticas, sendo realizadas através dos Sistemas de Análise Estatística (SAS Institute Inc., Cary, NC).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito da radiação UV-B em *C. rosea* sobre discos de folhas de morango em diferentes concentrações de conídios. A incidência e a esporulação de *C. rosea* em superfície do disco de folha foram influenciadas pela dose de radiação UV-B e a concentração de conídios do antagonista, mas não houve interações significativas entre os fatores ( $P > 0,05$ ). Quanto maior a concentração de conídios, maior a incidência e esporulação do antagonista, independentemente da dose de radiação UV-B (Figura 1. A B). Do mesmo modo, o aumento da dose de UV-B reduziu a incidência e esporulação do antagonista, independentemente da concentração de conídios (Figura 1. C, D).

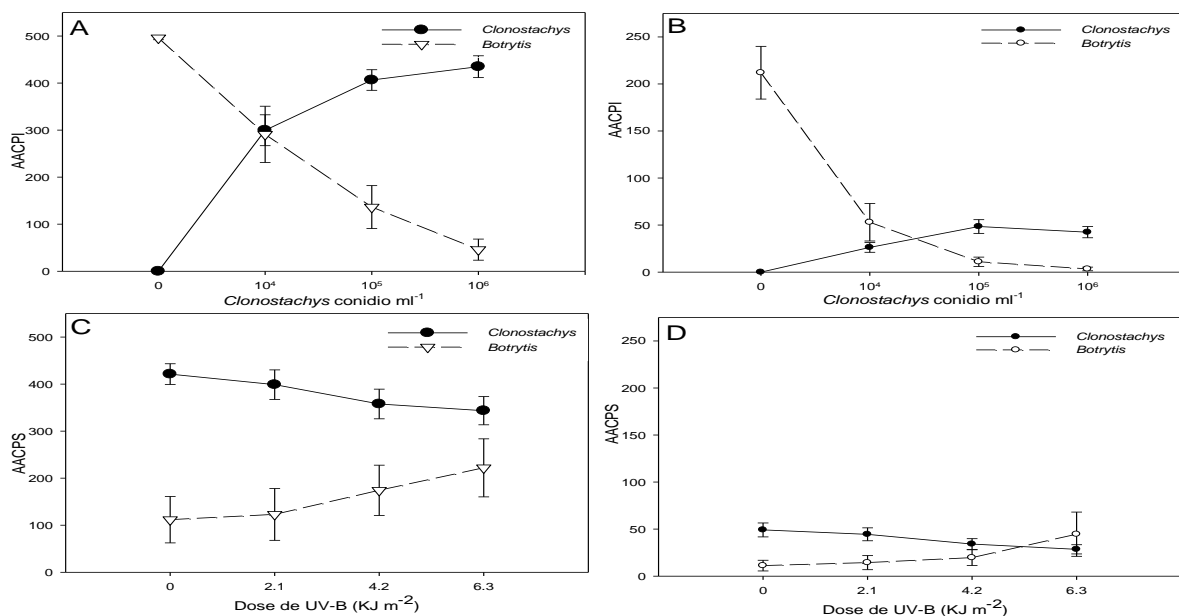


FIGURA 1. Efeito de concentrações de conídios de *Clonostachys rosea* em quatro doses de radiação UV-B em disco de folha de morango e desafiados com *Botrytis cinerea*. A) Área abaixo da curva de progresso da incidência de *C. rosea* (—), desafiado com *B. cinerea* (---) em discos de folhas sobre diferentes concentrações de *C. rosea* (0 a 10<sup>6</sup> conídios mL<sup>-1</sup>); B) Área abaixo da curva de progresso da incidência de *C. rosea* (—), desafiado com *B. cinerea* (---) em discos de folhas com *C. rosea* sendo irradiadas em diferentes doses de radiação UV-B 0 a 6,3 KJ m<sup>-2</sup>). C) Área abaixo da curva de progresso da esporulação de *C. rosea* (—), desafiado com *B. cinerea* (---) em discos de folhas sobre diferentes concentrações de *C. rosea* (0 a 10<sup>6</sup> conídios mL<sup>-1</sup>). D) Área abaixo da curva de progresso da esporulação de *C. rosea* (—), desafiado com *B. cinerea* (---) em discos de folhas, com *C. rosea* sendo irradiadas com doses de radiação UV-B (0 a 6,3 KJ m<sup>-2</sup>).

Os efeitos deletérios da radiação UV-B sobre o crescimento de *C. rosea* foram mais pronunciados nas menores concentrações de esporos. Com 10<sup>4</sup> conídios mL<sup>-1</sup> a AACPI e AACPE de *C. rosea* foi reduzido em 40% e 60%, respectivamente, quando comparados a 0 (controle) e 6,3 KJ m<sup>-2</sup>. Na concentração 10<sup>6</sup> conídios mL<sup>-1</sup>, as reduções foram de 3% e 40% para AACPI e AACPE de *C. rosea*, respectivamente, para as mesmas doses de radiação UV-B.

O presente estudo demonstrou que a radiação UV-B pode afetar a viabilidade de inóculo de *C. rosea* e reduzir sua capacidade de controlar *B. cinerea* em folhas de morango. Aumentos na radiação UV-B reduziu a viabilidade do antagonista e os efeitos foram mais pronunciados em menores concentrações de esporos. Com 10<sup>6</sup> mL de conídios<sup>-1</sup> a viabilidade dos conídios foi reduzida para 40%,

enquanto que a  $10^4$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ , a redução foi de até 60%. Por conseguinte, a incidência de *B. cinerea* aumentou até duas vezes e a esporulação até três vezes. Apesar de não avaliada neste estudo, é possível que a radiação UV-B não seja tão prejudicial para o patógeno, como é para *C. rosea*.

Redução da esporulação de *Botrytis cinerea* em discos de folhas tratadas com diferentes concentrações de conídios *C. rosea*, irradiadas com UV-B e desafiados pelo patógeno. A incidência e a esporulação de *B. cinerea* em discos foliares foram inversamente correlacionadas com a incidência e esporulação de *C. rosea* (coeficientes de correlação de Pearson de  $p = -0,8184$  e  $p = -0,5962$ , respectivamente, para *B. cinerea* incidência e gravidade). O crescimento do patógeno foi maior na concentração mais baixa de *C. rosea*. A aplicação de  $10^4$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  do agente de biocontrole, independentemente da dose de UV-B, reduziu a incidência e a esporulação média do patógeno em 40% e 80%, respectivamente. A concentração mais elevada de *C. rosea* ( $10^6$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ ) reduziu a incidência e severidade de 91% e 98% de *B. cinerea* em discos foliares de morango.

A radiação UV-B reduziu a capacidade de *C. rosea* para controlar *B. cinerea*. A dose mais elevada de UV-B reduziu a presença e a esporulação de *C. rosea* em 20% e 42%, respectivamente. Por conseguinte, a incidência de *B. cinerea* aumentou duas vezes e a esporulação três vezes.

## CONCLUSÕES

Além de menor crescimento sob radiação UV-B, os conídios de *C. rosea* apresentaram menor capacidade antagonista. Estudos adicionais são necessários para observar a tolerância de conídios de *B. cinerea* a radiação UV-B e, assim, provar que um ambiente com radiação UV-B aumentada pode favorecer o patógeno resultando numa menor capacidade de *C. rosea* em controlar *B. cinerea*.

## AGRADECIMENTOS

Este artigo é parte da dissertação de M.Sc. do primeiro autor. Agradecimentos a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão de bolsa do primeiro autor. Agradecemos ao projeto "Impactos das mudanças climáticas sobre doenças de plantas, pragas e plantas daninhas" (CLIMAPEST Infoseg 12198 EMBRAPA), que está ligado à Macroprograma 1 - Grandes Desafios Nacionais, como parte da Embrapa Meio Ambiente.

## REFERÊNCIAS

BLANCO, C., DE LOS SANTOS, B. ROMERO, F. Relationship between concentrations of *Botrytis cinerea* conidia in air, environmental conditions, and the incidence of grey mould in strawberry flowers and fruits. **European Journal of Plant Pathology**, v.114, n.4, Apr, p.415-425. 2006.

BRAGA, G. U. L.; FLINT, S. D.; MILLER, C. D.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Variability in response to UV-B among species and strains of *Metarhizium* isolated from sites at latitudes from 61 degrees N to 54 degrees S. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.78, n.2, p.98-108. 2001.

COSTA, L. B. Efeito da radiação Ultravioleta-B sobre *Trichoderma* spp. e *Clonostachys rosea*, agentes de biocontrole de fitopatógenos. Lavras: Universidade Federal de Lavras: 1-80 p. 2011.

GULLINO, M. L.; ALOI, C.; GARIBALDI, A.C. Influence of spray schedules on fungicide resistance populations of *Botrytis cinerea* pers on grapevine. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v.95, p.87-94. 1989.

JARVIS, W. R. Managing diseases in greenhouse crops. **Plant Disease**, v.73, n.3, p.190-194. 1989.

MERTELY, J. C.; MACKENZIE, S. J.; LEGARD, D. E. Timing of fungicide applications for *Botrytis cinerea* based on development stage of strawberry flowers and fruit. **Plant Disease**, v.86, n.9, p.1019-1024. 2002.

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.; MATTOS, L. P. V.; SANTOS, E. R.; BONUGLI, R. C. Influence of application time on the establishment, survival, and ability of *Clonostachys rosea* to suppress *Botrytis cinerea* sporulation on rose debris. **Crop Protection**, v.27, n.1, p.77-83. 2008.

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.

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, Sep, p.247-257. 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.

RANGEL, D. E. N.; BUTLER, M. J.; TORABINEJAD, J.; ANDERSON, A. J.; BRAGA, G. U. L.; DAY, A. W.; ROBERTS, D. W. Mutants and isolates of *Metarhizium anisopliae* are diverse in their relationships between conidial pigmentation and stress tolerance. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.93, n.3, p.170-182. 2006.

SUTTON, J. C. Epidemiology and management of *Botrytis* leaf blight of onion and gray mold of strawberry - A comparative analysis. **Canadian Journal of Plant Pathology-Revue Canadienne de Phytopathologie**, v.12, n.1, p.100-110. 1990.

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

SUTTON, J. C.; PENG, G. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry leaves. **Phytopathology**, v.83, n.6, p.615-621. 1993.