Workshop sobre mudanças climáticas e problemas fitossanitários
12 a 14 de junho de 2012
Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna/SP

RADIAÇÃO, ESPECIALMENTE A UV-B, COMO FATOR LIMITANTE À GERMINAÇÃO DE UREDINIÓSPOROS DE *Hemileia vastatrix*

ANDIALE PINTO DOS SANTOS[1], WAGNER BETTIOL[2]

[1] Doutoranda em Proteção de Plantas, Faculdade de Ciências Agronômicas – UNESP, Botucatu-SP, andialep@yahoo.com.br
[2] Pesquisador, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP, bettiol@cnpma.embrapa.br

RESUMO: Objetivou-se avaliar a capacidade germinativa de urediniósporos de *Hemileia vastatrix* submetidos a diferentes doses de radiação UV-B. Urediniósporos de *H. vastatrix* coletados de lesões jovens da ferrugem do cafeeiro foram suspendidos em água contendo Tween 80 (0,02%), alíquotas de 20µL foram transferidas para placas de Petri contendo ágar-água. Os urediniósporos foram imediatamente expostos a seis diferentes doses de radiação UV-B e incubados durante 12 e 24 h. Avaliou-se um total de 300 urediniósporos/repetição considerando como germinado todos aqueles que apresentavam tubo germinativo formado com comprimento igual ou superior ao seu maior diâmetro. A inibição da germinação dos urediniósporos de *H. vastatrix*, mesmo decorridos 24h de sua germinação, foi diretamente proporcional ao aumento nos níveis de radiação UV-B. O decréscimo na germinação foi proporcional ao aumento das doses de UV-B, indicando que o aumento nos níveis de radiação UV-B pode constituir em um fator limitante para o desenvolvimento da infecção da ferrugem do cafeeiro.

PALAVRAS–CHAVE: ferrugem do cafeeiro, mudanças climáticas, ultravioleta.

INTRODUÇÃO

O sucesso de uma infecção fúngica depende, dentre outros fatores, da capacidade do conídio germinar, produzir um tubo germinativo e penetrar no hospedeiro. Os esporos fungicos constituem um importante veículo de sobrevivência e disseminação do patógeno a curtas e longas distancias sendo capaz de colonizar substratos como sementes, folhas, frutos, raízes e ramos entre outros. A germinação dos esporos constitui o primeiro passo para o inicio da infecção, impedir que esse processo ocorra constitui numa alternativa bem sucedida de controle (AGRIOS, 2004). Diversos fatores ambientais como a temperatura, umidade e luminosidade afetam a germinação de conídios de diversas espécies fúngicas (CAMPOS-SALES et al., 2008; STEVENSON et al., 1988; VIANA ; SOUZA, 2002).

A ferrugem do cafeeiro, causada por *Hemileia vastatrix* Berk & Br, constitui a principal doença dessa cultura e está disseminada por todas as regiões produtoras de café do mundo. O fungo coloniza a superfície abaxial das folhas causando desfolha além, de diminuir a área foliar fotossinteticamente ativa ocasionando menor produção de fotoassimilados pelas plantas.

Fatores ambientais como temperatura, ausência de luz e molhamento foliar constituem variáveis climáticas essenciais para que o urediniósporo germine e a doença se desenvolva. Temperaturas inferiores a 10 ºC e superiores a 35 ºC e a ausência de molhamento foliar inibem a germinação do fungo. O Brasil como o maior produtor e exportador de café encontra nesse fungo um entrave ao aumento de sua produção.

Às crescentes mudanças que estão ocorrendo no clima do planeta vem acarretando um aumento nos níveis de radiação ultravioleta incidente sobre a superfície da terra. Esse fato tem estimulado a realização de estudos sobre os possíveis efeitos desse aumento sobre as doenças de plantas e, seus hospedeiros (HAO et al., 2000; MARK ; TEVINE, 1996). Sabe-se que a radiação ultravioleta, em especial a UV-B, afeta o desenvolvimento de alguns fitopatogenos. Porém, seu efeito sobre a ferrugem do cafeeiro ainda permanece desconhecido. Nesse contexto objetivou-se avaliar o efeito que a radiação UV-B tem sobre a germinação de urediniósporos de *Hemileia vastatrix*.

MATERIAL E MÉTODOS

Urediniósporos de *H. vastatrix* foram coletados de lesões jovens de folhas de café cv Catuaí Vermelho mantidas no campo experimental da Embrapa Meio Ambiente, com um pincel de cerdas macias e suspendidos em água esterilizada acrescida de Tween 80 (0,02% v/v), na concentração de 2 mg mL^{-1}, sendo posteriormente homogeneizados com agitador orbital de tubos durante 2 minutos. Alíquotas de 20 µL da suspensão foram transferidas para placas de Petri de 5 cm de diâmetro contendo 9 mL de meio de cultura ágar-água (2% p/v) e, espalhada com alça de Drigalsky esterilizada ,a fim de uniformizar a suspensão de forma que todos os urediniósporos fossem submetidos à mesma dose de radiação, evitando assim sobreposições ou possíveis sombras de um urediniósporo sobre o outro. As placas foram imediatamente expostas a diferentes doses de radiação UV-B durante 15, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos. A irradiância media no interior da câmara foi de 620 mW m^{-2}. Placas controle foram cobertas com papel alumínio e, permaneceram por igual período no interior da câmara de UV-B.

A irradiância foi fornecida por quatro lâmpadas UVB 313 EL fluorescent lamps (Q-Lab Corporation, Cleveland, USA) com pico em 313 nm cobertas com filtro de diacetato de celulose 0,13mm capaz de bloquear toda radiação abaixo de 290 nm permitindo a passagem apenas da radiação que atinge a superfície da terra e, mensurada utilizando espectroradiômetro Ocean Optics SpectraSuite®. A irradiância ponderada no interior da câmara de UV-B (mW m^{-2}) foi calculada utilizando o espectro de ação de dano ao DNA desenvolvido por Quaite et al. (1992), normalizado para unidades de 300 nm, posteriormente transformados em KJ. Esse espectro de dano no DNA foi escolhido por ser o que mais se aproxima das respostas fúngicas de acordo com Paul et al. (1997). Decorrido o período de exposição às placas foram mantidas no escuro em estufa incubadora refrigerada do tipo B.O.D. a uma temperatura de 22 ºC e umidade relativa de 100%, durante 12 e 24 h. A germinação foi paralisada utilizando azul de lactofenol. Um total de 300 urediniósporos por placa foi mensurado, considerando-se como germinados todos aqueles cujo tubo germinativo excedia seu maior diâmetro. A análise da germinação foi realizada em microscópio de luz (Leitz Dialux 22) com aumento de 200x. O delineamento experimental foi em esquema fatorial inteiramente casualizado com cinco repetições, sendo que as placas foram retiradas da câmara de forma aleatória ao término de cada tempo de exposição. Os dados de germinação foram analisados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Doses maiores de radiação UV-B afetaram a germinação de urediniósporos de *H. vastatrix* independente do tempo de incubação conforme mostra a Figura 1. Houve um acréscimo na germinação dos urediniósporos quando os mesmos foram incubados por um período de 24 h em detrimento ao período de 12 h de incubação. Isso indica que a exposição dos urediniosporos à radiação UV-B por um período de até 60 minutos não promove a inibição da germinação dos urediniósporos, se os mesmos permanecerem no escuro sobre condições ideais de temperatura e umidade, mas, ocasiona um leve atraso na sua germinação, sendo necessário um período de tempo maior para que isso ocorra. No entanto, para um tempo de exposição maior (75 e 90 minutos) e, consequentemente uma maior dose de UV-B, a germinação foi nula, tanto para um tempo de incubação de 12 quanto de 24 h, isso pode indicar a necessidade de período maior no tempo de incubação (superior a 24 h) para que a germinação ocorra. Doses maiores de UV-B promoveram uma completa inibição da germinação. Futuros ensaios visando elucidar melhor esse assunto serão realizados.

Sabe-se que a radiação especialmente a UV-B causa vários danos ao DNA de seres vivos levando à formação de dímeros de pirimidinas no DNA, além de provocar alterações nas bases nitrogenadas acarretando um numero limitado de quebras nas cadeias de DNA (CHINGEN et al., 1995; FRIEBERG et al., 1995; GRIFFITHS et al., 1998), além de gerar formas reativas em aminoácidos aromáticos cujos resíduos podem sofrer desnaturação e levar a perda da função biológica de enzimas e proteínas (GERHARDT et al., 1999; HOLLOSY, 2002). Uma vez que durante o processo de germinação e formação do tubo germinativo ocorre a síntese de moléculas de RNA e DNA, possivelmente essa falta de germinação dos urediniósporos, submetidos a doses maiores de UV-B, seja decorrência de uma mutação irreversível em seu DNA e/ou RNA.

Os resultados evidenciam a sensibilidade de *H. vastatrix* à radiação UV-B o que pode reduzir sua viabilidade e dispersão. Como o fungo permanece levemente protegido da radiação direta do sol,

devido ao fato de colonizar a superfície abaxial da folha, possivelmente devido a esse aspecto de sua biologia, o fungo foi incapaz de desenvolver ao longo dos anos mecanismos que promovessem uma maior resistência à luz. Resultado semelhante foi encontrado por Isard; Dufault (2006) para *Phakopsora pachyrhizi* em soja, que ao ser submetido a doses superiores a 27,3 e 1,2 MJ m^{-2} não germinaram. Willocquet et al., (1996), trabalhando com o efeito da radiação UV-B sobre a germinação e crescimento micelial de *Uncinula necator* da uva, também observaram que ambos germinação e crescimento micelial do fungo foram afetados pela radiação UV-B. Mizubuti et al., (2000) também verificaram que a exposição de esporângios de *Phytophthora infestans* apresentava um decréscimo em sua viabilidade quando submetidos à radiação em dias de sol (irradiância solar > 600 W m^{-2}) em contra partida o mesmo não foi observado quando os mesmos foram expostos a radiação solar em dias nublados (irradiância solar < 400 W m^{-2}), o que de acordo com os autores dias nublados favorece a sobrevivência do esporângio.

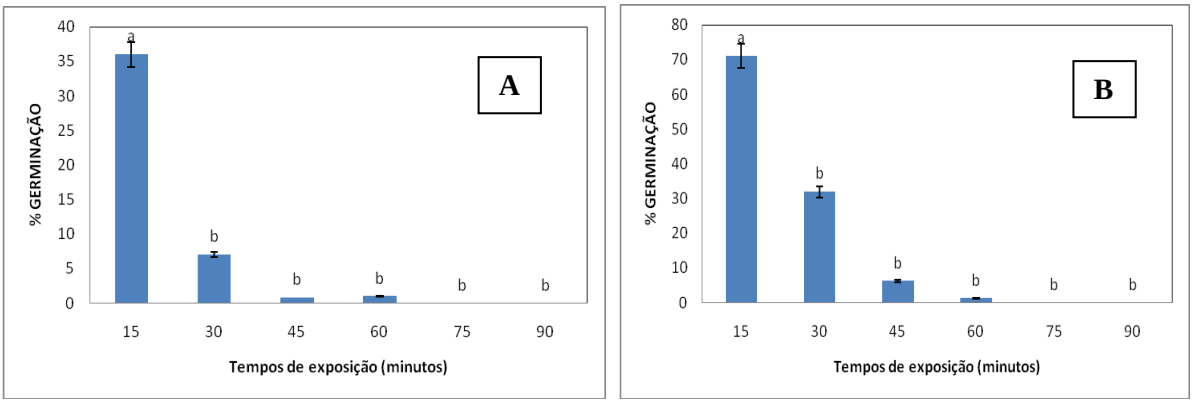

FIGURA 1. Efeito de diferentes tempos de exposição de urediniosporos de *H. vastatrix* à radiação UV-B após 12 h de incubação (**A**) e 24h (B). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

CONCLUSÕES

Altas doses de radiação UV-B ocasionam uma menor taxa de germinação em urediniósporos de *H. vastatrix.*

AGRADECIMENTOS

A CAPES, pela concessão da bolsa de pesquisa.

REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**, 5. ed. New York: Elsevier Academic press, 2005. 922p.

CAMPOS-SALES, C.; EIRA, A.F.; JESUS, M.A; CAMPAGNOLLI, F.; ANDRADE, M.C.N. Crescimento micelial de *Pleurotus ostreatus* em resíduo de *Simarouba amara*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, n.11, p. 1633-1635, 2008.

CLINGEN, PETER H.; ARLETT ,C.F.; COLE, J.; WAUGH, A.P. W.; LOWE, J.E.; HARCOURT, S.A.; HERMANOVA, N.; ROZA, L.; MORI, T.; NIKAIDO, O.; GREEN, M.H. L. GREEN. Correlation of UVC and UVB cytotoxicity with the induction of specific photoproducts in t-lymphocytes and fibroblasts from normal human donors. **Photochemistry and Photobiology**, v. 61, n. 2, p. 163-170, 1995.

FRIEDBERG, E.C.; WALKER, G.C.; SIEDE, W. **Dna repair and Mutagenesis**, Washington, DC: American Society for Microbiology, 1995. 698 p.

GERHARDT, K. E.; WILSON, M. I.; GREENBERG, B. M.Tryptophan photolysis leads to a UVB-lnduced 66 KDa photoproduct of ribulose-1,5 bisphosphate carboxylase/oxygenase (rubisco) in vitro and in vivo. **Photochemistry and Photobiology**, v. 70, n.1, p. 49-56, 1999.

GRIFFITHS, H.R.; MISTRY, P.; HERBERT, K.E.; LUNE, C. J. Molecular and cellular effects of ultraviolet light-induced genotoxicity. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**. v.35, n. 3, p.189-237, 1998.

GARFINKEL, D.J.; BAILIS, A.M. Nucleotide excision repair, genome stability, and human disease: new insight from model systems. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v.2, n. 2, p. 55-60, 2002.

HAO, X.; HALE, B.A.; ORMROD, D.P.; PAPADOPOULO, A.P. Effects of pre-exposure to ultraviolet-b radiation on responses of tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. New Yorker) to ozone in ambient and elevated carbon dioxide. **Environmental pollution**, v.110, n. 2, p. 217-224, 2000.

HOLLÓSY F. Effects of ultraviolet radiation on plant cells. **Micron**, v. 33, n. 2, p. 179-197, 2002.

ISARD, S. A.; DUFAULT, N. S.; MILES, M. R.; HARTMAN, G. L.; RUSSO, J. M.; DE WOLF, E. D.; MOREL, W. The effect of solar irradiance on the mortality of *Phakopsora pachyrhizi* urediniospores. **Plant Disease**, v.90, n. 7, p. 941-945, 2006.

MARK, U.; TEVINI, M. Combination effects of UV-B radiation and temperature on sunflower *(Helianthus annuus* L., cv. Polstar) and maize *(Zea mays* L., cv. Zenit 2000) seedlings. **Journal of Plant Physiology**, v. 148, n. 1-2, p. 49-56, 1996.

MIZUBUTI, E. S. G.; AYLOR, D. E.; FRY, W. E. Survival of *Phytophthora infestans* sporangia exposed to solar radiation. **Phytopathology**, v. 90, p.78-84, 2000.

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, p. 576-578, 1992.

STEVENSON, R.E.; PENNYPACKER, S.P. Effect of radiation, temperature and moisture on conidial germination of *Alternaria solani*. **Phytopatology**, v.78, p. 926-930, 1988.

SZTEJNBERG, A.; BLAKEMAN, P**.** Ultraviolet-induced changes in populations of epiphytic bacteria on beetroot leaves and their effect on germination of *Botrytis cinerea* spores. **Physiological Plant Pathology**, v 3, p. 443-351, 1973.

VIANA, F.M.P.; SOUZA, N. Efeito da interação temperatura-tensão de água sobre a germinação de micro escleródios de *Macrophomina phaseolina*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasilia, v.27, n. 3, p. 268-272, 2002.

WILLOCQUET, L.; COLOMBET, D.; ROUGIER, M.; FARGUES, J.; CLERJEAU, M. Effects of radiation, especially Ultraviolet B, on conidial germination and mycelial growth of grape powdery mildew. **European Journal of Plant Pathology**, v. 102, p. 441-449, 1996.