



LÚCIO BERTOLDO COSTA

**EFEITO DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA-B
SOBRE *Trichoderma* spp. e *Clonostachys rosea*,
AGENTES DE BIOCONTROLE DE
FITOPATÓGENOS**

LAVRAS – MG

2011

LÚCIO BERTOLDO COSTA

**EFEITO DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA-B SOBRE
Trichoderma spp. e *Clonostachys rosea*, AGENTES DE BIOCONTROLE
DE FITOPATÓGENOS**

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

Orientador

Dr. Wagner Bettiol

LAVRAS – MG

2011

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Costa, Lúcio Bertoldo.

Efeito da radiação Ultravioleta-B sobre *Trichoderma spp.* e
Clonostachys rosea, agentes de biocontrole de fitopatógenos / Lúcio
Bertoldo Costa. – Lavras : UFLA, 2011.

80 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Wagner Bettiol.

Bibliografia.

1. *Botrytis cinerea*. 2. Doença de plantas. 3. Controle biológico.
4. Mudanças climáticas. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

CDD – 632.96

LÚCIO BERTOLDO COSTA

**EFEITO DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA-B SOBRE
Trichoderma spp. e *Clonostachys rosea*, AGENTES DE BIOCONTROLE
DE FITOPATÓGENOS**

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

APROVADA em 22 de fevereiro de 2011.

Dr. Eduardo Alves

UFLA

Dr. Drauzio Eduardo Naretto Rangel

UNIVAP

Dr. Wagner Bettiol

Orientador

LAVRAS – MG

2011

A Deus que possibilitou que todo o universo se movesse a favor para que um sonho deixasse o plano da imaginação e se tornasse algo muito real e concreto.
Às pessoas que tornaram este trabalho possível.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, irmãos e familiares que tanto me incentivaram, estimularam e confiaram em meu potencial e, principalmente, propiciaram a oportunidade para eu ter realizado o mestrado.

À Universidade Federal de Lavras e, em especial, ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade do mestrado. Aos docentes do curso de fitopatologia da UFLA, por todo o conhecimento transmitido.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos que tornou possível todo este trabalho.

Ao meu orientador, Wagner Bettiol, e aos pesquisadores, Drauzio E. N. Rangel e Marcelo A. B. Morandi, pela participação em todo o trabalho e esclarecimento de dúvidas.

Aos meus colegas de mestrado, Anderson, Fernando, Marília, Maria Clara, Fabiano e Claudio, pela compreensão em alguns momentos e pelos muitos trabalhos realizados em conjunto.

Aos colegas do Laboratório da Embrapa Meio Ambiente Carlos, Carol, Abrahão, Wilielle, Fumiko e Alexandre, pelo companheirismo e, principalmente, pela amizade.

A todos os meus colegas de república: Luisão, Cido, Alexandre, Luciano, Luis Antônio e Andreolino.

RESUMO

Uma das limitações para a aplicação de agente de biocontrole é a sua sensibilidade à radiação ultravioleta. Nos últimos anos, a incidência da radiação Ultravioleta B (UV-B) vem aumentando gradativamente na Terra. Este trabalho teve por objetivo simular o efeito do aumento da radiação UV-B, incidente na superfície da Terra, sobre *Trichoderma* e *Clonostachys rosea*. No estudo foram selecionados isolados de *Trichoderma* e *C. rosea* tolerantes à radiação UV-B; avaliados os efeitos da radiação UV-B sobre a germinação dos conídios, em meio de cultura de isolados de *Trichoderma* e *C. rosea*, e crescimento e capacidade antagônica de *C. rosea* em discos de folha. Além disso, foi simulado e avaliado o aumento da radiação UV-B em campo e observados os possíveis efeitos sobre *C. rosea*. Os estudos permitiram concluir que: a radiação UV-B apresenta forte ação deletéria aos conídios de *C. rosea* e *Trichoderma*; os estádios de desenvolvimento da germinação apresentam sensibilidade diferenciada à radiação UV-B; todos os isolados de *Trichoderma* apresentaram maior resistência à radiação UV-B do que os de *C. rosea*; os isolados LQC 62 (*C. rosea*) e LQC 88, 99 e 96 (*Trichoderma* spp.) foram mais tolerantes à radiação UV-B, apresentando potencial para a utilização em futuros testes de controle biológico a campo; em discos de folha, *C. rosea* apresenta maior tolerância à radiação UV-B; em condições de campo a adição de radiação UV-B sobre *C. rosea* fez com que o organismo apresentasse menor presença e menor crescimento sobre os discos, e a radiação UV-B diminuiu, significativamente, o crescimento inicial de *C. rosea* em discos de folha e quanto menor a concentração de esporos maior o efeito da radiação UV-B sobre o crescimento de *C. rosea* e capacidade antagônica a *Botrytis cinerea*.

Palavras-chave: Mudanças climáticas. Controle biológico. Doenças de plantas. *Botrytis cinerea*.

ABSTRACT

One of the limitations for biological control agent application are your sensibility to the ultraviolet radiation. In the last years the incidence of the Ultraviolet B radiation (UV-B) is increasing gradually in the Earth. This work had for objective to simulate the effect of the increase of UV-B radiation, incident in the surface of the Earth, on *Trichoderma* and *C. rosea*. In the study it were selected strains of *Trichoderma* and *C. rosea* tolerant to UV-B radiation; evaluated the effects of the UV-B radiation about the germination of the conidia in middle of culture of strains of *Trichoderma* and *C. rosea*, and growth and antagonistic capacity of *C. rosea* in leaf disks. Besides, it was simulated and appraised the increase of the UV-B radiation in field and observed the possible effects on *C. rosea*. The studies allowed to end that: the UV-B radiation presents strong deleterious action to the conidia of *C. rosea* and *Trichoderma*; the stadiums of development of the germination present sensibility differentiated to the UV-B radiation; all the strains of *Trichoderma* presented larger resistance to UV-B radiation than *C. rosea*; strain LQC 62 (*C. rosea*) and LQC 88, 99 and 96 (*Trichoderma* spp.) were more tolerant to the UV-B radiation presenting potential for the use in futures tests of biological control in field; in leaf disks *C. rosea* presents larger tolerance to UV-B radiation; in field conditions the UV-B radiation addition on *C. rosea* did with that the organism comes smaller presence and smaller growth about the disks, and the UV-B radiation reduced the initial growth of *C. rosea* significantly in leaf disks and as smaller the concentration of conidia larger the effect of the UV-B radiation about the growth of *C. rosea* and antagonistic capacity the *Botrytis cinerea*.

Keywords: Climate changes. Biological control. Plant disease. *Botrytis cinerea*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	O controle biológico	17
2.2	Patossistema envolvido: <i>Botrytis cinerea</i>	17
2.3	Os agentes de biocontrole: <i>Trichoderma spp.</i>	20
2.4	<i>Clonostachys rosea</i>	21
3	MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1	Condições gerais dos estudos	24
3.1.1	Isolados e produção dos conídios	24
3.1.2	Preparo da suspensão de conídios	24
3.1.3	Meios de cultura utilizados	25
3.1.4	Batata Dextrose Agar + Benomyl e BDA + Oxygall	25
3.1.5	Paraquat-Clorofenicol-Ágar (PCA)	26
3.1.6	Germinação relativa	26
3.1.7	Produção de <i>Clonostachys rosea</i>	26
3.1.8	Câmara de radiação UV-B	27
3.1.9	Ensaio de campo	29
3.1.10	Análise dos resultados	30
3.2	Detalhes dos ensaios realizados	30
3.2.1	Sensibilidade da germinação de conídios de <i>Trichoderma sp.</i> e de <i>C. rosea</i> à radiação UV-B	30
3.2.2	Estabelecimento do período adequado de incubação dos conídios para avaliar a germinação	31
3.2.3	Seleção de isolados tolerantes à radiação UV-B	32
3.2.4	Curva de sobrevivência de <i>C. rosea</i> e <i>Trichoderma</i> submetidos à radiação UV-B	33
3.2.5	Sensibilidade dos conídios de <i>C. rosea</i> e <i>Trichoderma</i> em diversos estádios de germinação à radiação UV-B	33
3.2.6	Germinação de esporos e colonização de discos de folha por <i>C. rosea</i>	34
3.2.7	Sobrevivência de <i>C. rosea</i> em discos de folha sob diversos tempos de exposição à radiação UV-B	35
3.2.8	Efeito da radiação UV-B sobre a capacidade antagônica de <i>C. rosea</i> a <i>B. cinerea</i>	35
3.2.9	Efeito da radiação ultravioleta-B na sobrevivência de <i>C. rosea</i> em condições de campo	36
3.2.10	Efeito da radiação ultravioleta-B no estabelecimento de <i>C. rosea</i> em condições de campo	36

3.2.11	Comparação entre os ensaios de sobrevivência e estabelecimento de <i>C. rosea</i>	37
4	RESULTADOS	38
4.1	Sensibilidade da germinação de conídios de <i>Trichoderma</i> sp. e de <i>C. rosea</i> à radiação UV-B.....	38
4.2	Estabelecimento do período adequado de incubação dos conídios para avaliar a germinação	39
4.3	Seleção de isolados tolerantes à radiação UV-B.....	40
4.4	Curva de sobrevivência de <i>C. rosea</i> e <i>Trichoderma</i> submetidos à radiação UV-B	41
4.5	Sensibilidade dos conídios de <i>C. rosea</i> e <i>Trichoderma</i> em diversos estádios de germinação à radiação UV-B.....	42
4.6	Germinação de esporos e colonização de discos de folha por <i>C. rosea</i>	43
4.7	Sobrevivência de <i>C. rosea</i> em discos de folha sob diversos tempos de exposição à radiação UV-B.....	45
4.8	Efeito da radiação UV-B sobre a capacidade antagônica de <i>C. rosea</i> em <i>B. cinerea</i>	48
4.9	Efeito da radiação ultravioleta-B na sobrevivência de <i>C. rosea</i> em condições de campo	54
4.10	Efeito da radiação ultravioleta-B no estabelecimento de <i>C. rosea</i> em condições de campo	56
4.11	Comparação entre os ensaios de sobrevivência (item 4.9) e estabelecimento (item 4.10) de <i>C. rosea</i>	59
5	DISCUSSÃO	60
6	CONCLUSÕES	66
	REFERÊNCIAS	67

1 INTRODUÇÃO

O aumento nas concentrações de dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄), monóxido de carbono (CO), óxido nitroso (N₂O), óxido de nitrogênio (NO_x) e ozônio (O₃), gases relacionados ao efeito estufa, estão causando mudanças climáticas (GHINI; HAMADA; BETTIOL, 2008) que recebem grande destaque na mídia e são objeto de estudo de considerável número de pesquisadores. Além disso, não está prevista a redução da concentração de nenhum desses gases em curto prazo, antevendo dessa forma que os habitantes do planeta Terra sofrerão as consequências dessas mudanças por muitos anos (INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE - IPCC, 2007).

Alterações climáticas influenciam diretamente a produção agrícola alterando a fisiologia, o crescimento e o rendimento das culturas (AINSWORTH et al., 2002; PERCY et al., 2003). Além disso, podem alterar as relações entre patógeno e hospedeiro, ocasionando maior problema com pragas e doenças (COAKLEY; SCHERM; CHAKRABORTY, 1999; MCELRONE et al., 2010). Em decorrência das mudanças previstas, será necessário, também, rever técnicas agrícolas que podem perder a eficácia e tornar a agricultura, ainda, mais dependente de agroquímicos para suprir as adversidades, resultando em maior custo na produção e, conseqüentemente, em toda a cadeia consumidora (HANNUKKALA et al., 2007).

O trabalho teve por objetivos avaliar o efeito da radiação UV-B sobre a germinação dos conídios de isolados de *Trichoderma* e *C. rosea*; selecionar os isolados de *Trichoderma* e *C. rosea* tolerantes à radiação UV-B; observar o efeito da radiação UV-B sobre os diferentes estádios da germinação dos conídios; avaliar o efeito de várias doses de radiação UV-B sobre a presença e crescimento de *C. rosea* em diferentes concentrações sob discos de folha; observar o efeito de diferentes concentrações de *C. rosea* e várias doses de

radiação UV-B sobre a capacidade antagônica a *Botrytis cinerea*; e simular aumento da radiação UV-B a campo e observar possíveis efeitos sobre um isolado de *C. rosea* sobre o tecido do hospedeiro.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Um fator de grande impacto na agricultura está 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). Durante anos os cientistas vêm mostrando os efeitos danosos da radiação ultravioleta sobre diferentes organismos e todas as alterações moleculares e celulares decorrentes desse processo (SCHADE; ESSER; KRUTMANN, 2005).

No entanto, 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). O CFC é conduzido por correntes de ar onde se acumula, principalmente, nos pólos do globo, resultando em perdas acentuadas de ozônio nessas regiões (TANHUA et al., 2009). Assim, têm surgido falhas nessa camada conhecidas como “buracos na camada de ozônio” (JOHNSON,

2003). Os primeiros trabalhos, relativos ao buraco na camada de ozônio, deram-se na década de 80 com Chubachi e Farman (GODIN-BEEKMANN, 2010).

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 (GODIN-BEEKMANN, 2010; MCKENZIE et al., 2007).

Com essa perspectiva de futuro, faz-se necessário refletir os efeitos das condições climáticas adversas sobre os diferentes agrossistemas. Além da diminuição da camada de ozônio, resultando em aumento da radiação UV-B terrestre (LEUN, 2004; MADRONICH et al., 1998), é necessário calcular o efeito sinérgico com o aquecimento global (IPCC, 2007).

Fatores ambientais influenciam fortemente na irradiância local de UV-B na Terra como: estação do ano, latitude, longitude, duração do fotoperíodo e nuvens (MADRONICH; DEGRUIJL, 1993). É observado, também, que a irradiância de UV-B na Terra aumenta com a altitude (CABRERA; BOZZO; FUENZALIDA, 1995) e diminui com o aumento da latitude (PIAZENA, 1996).

A radiação UV-B em mar aberto pode penetrar por até 30 metros de profundidade, enquanto que em ambientes litorâneos esse número pode aumentar dependendo das propriedades físico-químicas da água (TEDETTI; SEMPERE, 2006). Com isso, o fitoplâncton da zona eufótica, que é a base alimentar no ambiente marítimo, pode sofrer dano no DNA, diminuir a pigmentação e aumentar a permeabilidade celular resultando em menor absorção de nutrientes (SOBRINO; MONTERO; LUBIAN, 2004). Existem estudos sobre exposições de macroalgas à radiação UV-B artificial aumentado, mostrando que há diminuição de fotossíntese; menor absorção de nitrogênio, crescimento e

capacidade reprodutiva, e, principalmente, dano ao DNA (BISCHOF et al., 2007; HOLZINGER; LUTZ, 2006). Entretanto, esses resultados podem se intensificar quando se utilizam estádios juvenis dessas algas durante a avaliação (ROLEDA et al., 2007).

Para plantas existe uma quantidade considerável de trabalhos mostrando os efeitos danosos da radiação UV-B, que são absorvidos por biomoléculas como proteínas, pigmentos e ácidos nucleicos. Assim, a elevação da radiação UV-B pode resultar em degradação acelerada destas biomoléculas (CALDWELL et al., 1998; CALDWELL; FLINT, 1994). Todas essas reações resultarão em diminuição de produção de importantes culturas (KOTI et al., 2005; MOHAMMED; TARPLEY, 2010), principalmente, pela redução da capacidade fotossintética (ZHAO et al., 2004), alterações nos estádios fenológicos e até mesmo pela diminuição da reprodução destas culturas (MOHAMMED; TARPLEY, 2010; PHOENIX et al., 2001).

Ainda em plantas, a radiação UV-B reduz o crescimento, em virtude do estresse provocado pela formação de compostos de defesa (GERM et al., 2010; JAAKOLA; HOHTOLA, 2010) que visam proteger seu DNA dos efeitos danosos da radiação UV-B (ROZEMA et al., 1997). Trabalhos mostram que o estresse da planta pela radiação UV-B pode deixá-la mais resistente ao estresse de origem abiótica (BALLARE, 2003). Por outro lado, existe o efeito estimulante da radiação UV-B na expressão de genes de resistência de plantas a fitopatógenos (ANTOIGNONI et al., 2007; KUNZ et al., 2006). Entretanto, isso pode variar conforme a planta, cultivar e local do ensaio (PAUL; GWYNN-JONES, 2003). Segundo Turunen e Latola (2005), plantas do hemisfério sul e de habitats montanhosos apresentam maior adaptabilidade à radiação UV-B que plantas do hemisfério norte de regiões mais baixas.

Outro fator ligado à agricultura está na distribuição geográfica dos patógenos que devem ser alterados com as mudanças climáticas, pois, a radiação

UV-B pode afetar o hospedeiro, o vetor e o patógeno (SHEA et al., 2008). Com isso será necessário rever a eficácia de moléculas químicas e seus efeitos nesse novo ambiente previsto (BOXALL et al., 2009), até mesmo será necessário rever o impacto causado dessas moléculas nesse novo ambiente.

Segundo Alvarado-Gutierrez et al. (2008), plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) têm a expressão de genes de resistência aumentada quando essas são expostas a doses de radiação UV-B tornando-as plantas mais tolerantes a *Colletotrichum lindemuthianum*. O mesmo resultado foi observado por Kunz et al. (2008), utilizando *Arabidopsis thaliana* e o patógeno biotrófico *Hyaloperonospora parasitica*. Entretanto, nenhum dos autores concluiu se o tipo de resistência foi local ou sistêmica. Existem trabalhos em que a radiação ultravioleta atua diretamente na indução da esporulação (ENSMINGER, 1993). Esse fato é importante na produção de hortaliças onde ao trocar o plástico convencional, que permite a passagem da radiação ultravioleta, por um plástico que não permite a passagem da radiação UV, há redução da incidência de doenças na casa de vegetação, pois, a esporulação de diversos patógenos é reduzida (HONDA; YUNOKI, 1977; NICOT et al., 1996). Entretanto, acredita-se que aumentos de baixa intensidade de radiação UV aumentem a esporulação e aumentos drásticos da radiação UV inibam a esporulação (LEACH; TRIONE, 1966).

Indiscutivelmente, a radiação solar é o fator que mais interfere durante aplicação de um agente de controle biológico a campo (BRAGA et al., 2001b; LI; FENG, 2009; 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., 2001b). Entretanto, mudanças no método de multiplicação (MOORE et al., 1993; RANGEL et al., 2004) e aditivos usados

na formulação podem aumentar a resistência e/ou diminuir a exposição do conídio às radiações UV-B e UV-A (REDDY et al., 2008).

Em células, as radiações UV-B e UV-A causam desorganização nas membranas celulares, desnaturação de proteína, inativação do metabolismo respiratório, estresse oxidativo, dano ao DNA, RNA e ribossomos. Em relação ao dano ao DNA, ocorre a formação de dímero de pirimidina ciclobutano (DPC), pirimidina e pirimidinone que se acumulam no interior celular impedindo a duplicação do material genético (GRIFFITHS et al., 1998).

Em virtude de tantas modificações, é necessário avaliar a tolerância de isolados de diversos agentes de controle biológico à radiação UV-B. Para *Metarhizium* existe uma gama considerável de trabalhos, por causa desse agente, amplamente, utilizado na agricultura, para controle de insetos, pragas, principalmente, em regiões produtoras de cana-de-açúcar. No entanto, o efeito da radiação UV-B deve ser, também, estudado para outros microrganismos como os agente de biocontrole *Trichoderma* spp. e *C. rosea*. Segundo Braga et al. (2001d), isolados de *Metarhizium* pertencentes a regiões tropicais são mais tolerantes à radiação UV-B que isolados de regiões temperadas. Porém, não houve essa mesma correlação com isolados de *Beauveria brassiana* (FERNANDES et al., 2007).

Esses fatores mostram a importância do trabalho onde foi buscado avaliar o efeito da radiação UV-B em dois agentes de controle biológico de doenças de plantas, em que esses bioagentes são utilizados com sucesso. O patossistema proposto neste estudo foi *Botrytis cinerea* em morangueiro em cultivo protegido sendo controlado por isolados de *C. rosea*.

2.1 O controle biológico

Existem diferentes conceitos para controle biológico de doenças de plantas. O mais aceitado é o de Cook e Baker (1983, p. 254) que conceitua controle biológico como sendo:

A redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno, realizada por ou através de um ou mais organismos que não o homem.

Os agentes de controle biológico podem atuar por meio de vários mecanismos, como antibiose, parasitismo, competição, hipovirulência, predação e indução de defesa do hospedeiro (BETTIOL; GHINI, 1995). Dentre os mecanismos citados, os agentes de controle utilizados neste trabalho se destacam nessas características.

2.2 Patossistema envolvido: *Botrytis cinerea*

O patógeno é um fungo necrotrófico, cosmopolita, capaz de atacar mais de 200 gêneros de plantas (JARVIS, 1989). Esse patógeno é causador da doença conhecida como mofo-cinzeno, sendo uma das doenças mais destrutivas no sistema de cultivo protegido. Culturas como a roseira, o morangueiro, o tomateiro, o crisântemo e o eucalipto são acometidas quando produzidas em escala industrial (GULLINO; ALOI; GARIBALDI, 1989).

Na Nova Zelândia acredita-se que um quinto da produção comercial de morangos seja perdida a partir de doenças originárias de fungos, sendo o mofo-cinzeno o principal (TIMUDO-TORREVILLA et al., 2005). O fungo causa perdas de até 50% na cultura do morango em campo (BLANCO; SANTOS; ROMERO, 2006). Esse patógeno é capaz de atacar a cultura no campo, no

período da colheita, no transporte e durante o comércio da fruta (CARD et al., 2009). Em morango, todas as partes da planta são suscetíveis ao patógeno desde frutos, hastes, folhas e flores (SUTTON, 1990), tecido senescente serve como meio de cultura para o patógeno crescer e aumentar o inóculo (GUETSKY et al., 2001). Na fruta a infecção se inicia, geralmente, durante a época de florescimento onde conídios do patógeno infectam o tecido causando uma infecção latente que irá expressar apenas após o amadurecimento do fruto (POWELSON, 1960).

Esse patógeno cresce bem em restos de cultura na superfície do solo, sendo essa a principal fonte de inóculo. A produção de conídios se dá em temperaturas acima de 12 °C (ideal 15 a 20 °C) e alta umidade relativa (90 %). A infecção pelo conídio e o crescimento do patógeno ocorre a partir dos 10 °C, porém, a temperatura ótima está em torno de 25 °C (JARVIS, 1989).

Por isso, a alteração do ambiente tornando-o desfavorável ao patógeno é uma excelente tática de controle. Recomenda-se a circulação de ar para evitar acúmulo de água livre sobre a planta e, assim, reduzindo a infecção pelo patógeno (JARVIS, 1989). Medidas fitossanitárias como eliminação de restos culturais, diminuindo a pressão de inóculo do patógeno são recomendadas. O aumento do espaçamento entre plantas tem-se um dossel menos denso, o que permite melhor penetração da luz e, conseqüentemente, com redução da senescência precoce das folhas mais baixas e redução dos sítios favoráveis à infecção do patógeno. A solarização, também, deve ser utilizada como medida de controle do patógeno (LÓPEZ-HERRERA et al., 1994).

Durante muitos anos o controle do mofo-cinzento foi realizado com sucesso, exclusivamente, com fungicidas durante o florescimento das culturas (MERTELY; MACKENZIE; LEGARD, 2002). Entretanto, em várias partes do mundo vêm-se relatando a resistência do patógeno aos fungicidas utilizados em virtude da seleção de organismos resistentes (BARDAS; MYRESIOTIS;

KARAOGLANIDIS, 2008; TIMUDO-TORREVILLA et al., 2005). Isto tem levado a uma aplicação em intervalos cada vez menores, com concentrações maiores de ingredientes ativos e, também, na mistura de princípios ativos (CARD et al., 2009; GULLINO; ALOI; GARIBALDI, 1989; NORTHOVER; MATTEONI, 1986), com crescentes resíduos de agrotóxicos nos frutos para consumo (RABOLLE et al., 2006).

O controle com cultivares resistentes não tem sido efetivo, em decorrência do patógeno apresentar grande variabilidade genética e ser um patógeno necrotrófico (WILLIAMSON et al., 2007).

Com isso, o controle biológico tem se mostrado cada vez mais promissor como tática do controle para esse patógeno obtendo bons resultados em diversas culturas (BOFF et al., 2002; CARD et al., 2009; COTA et al., 2008a, 2008b; PENG; SUTTON, 1991; SWADLING; JEFFRIES, 1996; TRONSMO; DENNIS, 1977). Segundo Peng e Sutton (1991), isolados de *C. rosea* suprimiram em até 98% a doença em ensaios em casa de vegetação com eficiência igual ou superior ao fungicida padrão no controle da doença. Esse resultado se deve ao fato da competição ser um dos principais mecanismos de controle de patógenos como *B. cinerea*, que necessitam de uma fonte externa de açúcares para causar a infecção. Esse fato é importante para o sucesso na utilização de *C. rosea* ao controle do patógeno.

Atualmente existe uma gama de agentes de biocontrole para *B. cinerea* entre eles: *Trichoderma harzianum* (ELAD et al., 1993; FREEMAN et al., 2004), *C. rosea* (PENG; SUTTON, 1991), *Pseudomonas cepacia* (HAMMER; EVENSEN; JANISIEWICZ, 1993) e *Bacillus subtilis* (TATAGIBA et al., 1998).

2.3 Os agentes de biocontrole: *Trichoderma spp.*

Um dos agentes de biocontrole mais conhecidos, com distribuição mundial e, facilmente, isolado do solo, madeira e matéria orgânica (HOWELL, 2003) é o fungo *Trichoderma*. Outra característica de sucesso é que *Trichoderma* é atóxico a homens e a animais, além de apresentar custo acessível e fácil produção massal e dispersão de propágulos.

Sua primeira descrição como agente de biocontrole de doenças de plantas foi em 1930 (WEINDLING, 1932), sendo logo, em seguida, utilizado para controle de uma grande gama de fitopatógenos. *Trichoderma* é, ainda, o agente de controle biológico de doenças de plantas mais estudado no Brasil. Em 2007, acredita-se que tenham sido produzidas no Brasil mais de 550 toneladas de produto à base de *Trichoderma* (MORANDI; BETTIOL, 2009).

Trichoderma é um organismo efetivo de controle biológico por apresentar diversos mecanismos de ação contra patógenos. Primeiramente *Trichoderma spp.* foi descrito como importante micoparasita, sendo o primeiro caso de controle envolvendo *Rhizoctonia solani* em sementes, ainda, na década de 30. Dois anos após, foi descoberta sua capacidade de antibiose, pois, comprovou que o fungo eliminava substâncias tóxicas no meio de cultura a outros microrganismos (HOWELL, 2003).

Outra característica importante de *Trichoderma* e sua capacidade de competir e sobreviver na rizosfera, porque é capaz de prevalecer especialmente em ambientes úmidos e pode ser isolado de todas as zonas climáticas, incluindo solos de desertos (KLEIN; EVERLEIGH, 1998). Existem trabalhos onde *Trichoderma* pode ser aplicado em sementes e o seu crescimento acompanha todo o desenvolvimento radicular da planta promovendo, assim, supressão a patógenos causadores de tombamentos (HOWELL et al., 2000; ZHANG; HOWELL; STARR, 1996). Faria, Albuquerque e Cassetari Neto (2003)

obtiveram resultados promissores com sementes de algodoeiro onde *Trichoderma harzianum* promoveu aumento no estande e uma emergência mais vigorosa quando comparados com alguns fungicidas.

Trichoderma, ainda, produz enzimas do grupo das quitinases e/ou glucanases que são responsáveis pela supressão de diversos patógenos, quebrando a parede celular e rompendo a célula. Metcalf e Wilson (2001) comprovaram que o isolado de *Trichoderma* é capaz de colonizar raízes de cebola e infectar hifas do patógeno *Sclerotium cepivorum* diminuindo a incidência do mesmo. A indução de resistência do hospedeiro por ação de *Trichoderma*, também, foi comprovada. A expressão de genes de resistência de pepino foi induzida por um isolado de *Trichoderma asperellum* o qual envolveu a síntese de ácido jasmônico e etileno, protegendo, assim, a planta de *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (SHORESH; YEDIDIA; CHET, 2005).

A capacidade de promoção de crescimento do hospedeiro por *Trichoderma*, também, foi comprovada para algumas linhagens do antagonista que se mostraram aptas a promover efeito direto no crescimento e no florescimento de plantas hortícolas (BAKER, 1989). Segundo Cassiolo, Baker e Melo (1998), linhagens mutantes de *Trichoderma* resistentes a benomyl, promoveram aumento no estande e no índice de matéria seca de plantas de alface quando o agente de biocontrole foi aplicado no solo de cultivo.

2.4 *Clonostachys rosea*

C. rosea [(sin. *Gliocladium roseum*: teleomorfo *Bionectria ochroleuca*) (SCHROERS et al., 1999)] é encontrado comumente como fungo saprófita de solo com distribuição cosmopolita (SCHROERS, 2001). O fungo é conhecido como agente de biocontrole de muitos fungos fitopatogênicos, incluindo *B. cinerea*, *Didymella rabiei*, *Alternaria radicina* e *A. dauci* (VICCINI et al.,

2009). Um isolado de *C. rosea* (ACM941) controlou o complexo da podridão das raízes em ervilha (PRRC) no Canadá (XUE, 2003). Além do controle de doenças de plantas, existem trabalhos mostrando que o fungo produz toxinas com ação nematicida para as espécies *Caenorhabditis elegans*, *Panagrellus redivivus* e *Bursaphelenchus xylophilus* (DONG et al., 2004). Na Argentina foi relatada pela primeira vez sua ação como fungo entomopatogênico de duas espécies de lepidópteros *Oncometopia tucumana* e *Sonesimia grossa* (TOLEDO et al., 2006).

Assim como *Trichoderma*, *C. rosea* apresenta diversos mecanismos de ação contra fitopatógenos, incluindo micoparasitismo de hifas (YU; SUTTON, 1997) e estruturas de resistência; competição por nutrientes e/ou substrato (MORANDI et al., 2000; SUTTON et al., 1997; SUTTON; PENG, 1993) e finalmente indução de resistência no hospedeiro (LAHOZ; CONTILLO; PORRONE, 2004; SUTTON et al., 1997).

Esse agente de biocontrole é eficiente na cultura do morangueiro em cultivo protegido em virtude do antagonismo apresentado a *B. cinerea*, pois, foi evidente a capacidade de suprimir a esporulação e a infecção do patógeno em decorrência da competição por fonte de energia e, assim, protegendo folhas, flores e frutos do hospedeiro (PENG; SUTTON, 1991; SUTTON; PENG, 1993). *C. rosea* coloniza, sem expressão de sintomas, raízes, hastes, vagens e sementes de soja (MUELLER; SINCLAIR, 1986), folhas de morangueiro e de framboesa (SUTTON et al., 1997). O agente de biocontrole é capaz de suprimir a esporulação do patógeno em restos de culturas colonizando antes do patógeno. (MORANDI et al., 2003, 2006). No Brasil, são promissores os resultados com *C. rosea* controlando o mofo-cinzento em morango, sendo mais eficiente que o fungicida em condições de campo (COTA et al., 2008a, 2008b).

Segundo Sutton e Peng (1993), *C. rosea* é um excelente agente de biocontrole porque é ótimo saprófita de solo e coloniza muito bem restos

culturais. *C. rosea* compete com o crescimento saprofítico do patógeno, impedindo a colonização endofítica de tecidos senescentes e, conseqüentemente, a sua esporulação. Os resultados são potencializados quando o agente de biocontrole é aplicado antes ou ao mesmo tempo em que o patógeno (SUTTON; PENG, 1993).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Condições gerais dos estudos

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Quarentena “Costa Lima” (LQC) do Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental (CNPMA) – Embrapa Meio Ambiente, situado em Jaguariúna, São Paulo.

3.1.1 Isolados e produção dos conídios

Os isolados de *Trichoderma* e *Clonostachys rosea* foram cultivados em meio de Batata-Dextrose-Ágar (BDA) (Acumedia Manufacturers, Michigan) contidos em placas de Petri e incubados em câmara de crescimento a 25 ± 2 °C com fotoperíodo de 12 h durante 21 dias. Os isolados utilizados são provenientes da coleção de microrganismos do LQC (Tabela 1).

3.1.2 Preparo da suspensão de conídios

Os conídios foram suspensos em suspensão de Tween 80 (0,01% v/v) e filtrados em membrana de policarbonato esterilizada (porosidade 8 μm , Nalgon[®], Germany). A concentração utilizada foi de (10^5 conídios m^{-1}), determinada com auxílio de hemacitômetro.

Tabela 1 Origem dos isolados de *Clonostachys rosea*, *Trichoderma* spp. e *Botrytis cinerea* utilizado nos ensaios

Isolado	Espécie	Cultura de origem	Local de origem	Data no laboratório
LQC 59	<i>C. rosea</i>	Morango	Serra Negra, SP	14/03/2003
LQC 60	<i>C. rosea</i>	Rosa	Holambra, SP	07/04/2005
LQC 62	<i>C. rosea</i>	Rosa	UFV Viçosa, MG	18/07/2002
LQC 73	<i>C. rosea</i>	Violeta	CNPMA Jaguariúna, SP	01/05/1993
LQC 87	<i>C. rosea</i>	Raiz de Alface	Jaguariúna, SP	25/05/2005
LQC 111	<i>C. rosea</i>	Não informado	Cepec Belém do Pará, MA	08/11/2005
LQC 112	<i>C. rosea</i>	Não informado	Cepec Belém do Pará, MA	08/11/2005
LQC 114	<i>C. rosea</i>	Não informado	Cepec Belém do Pará, MA	08/11/2005
LQC 88	<i>Trichoderma</i> sp.	Não informado	Patos de Minas, MG	08/11/2005
LQC 99	<i>Trichoderma</i> sp.	Não informado	Patos de Minas, MG	08/11/2005
LQC 96	<i>Trichoderma</i> sp.	Não informado	Patos de Minas, MG	08/11/2005
LQC 103	<i>Trichoderma</i> sp.	Não informado	Patos de Minas, MG	08/11/2005
LQC 93	<i>Trichoderma</i> sp.	Não informado	Patos de Minas, MG	08/11/2005
LQC 98	<i>Trichoderma</i> sp.	Não informado	Patos de Minas, MG	08/11/2005
LQC 107	<i>Trichoderma</i> sp.	Não informado	Patos de Minas, MG	08/11/2005
LQC 92	<i>Trichoderma</i> sp.	Não informado	Patos de Minas, MG	08/11/2005
LQC 91	<i>Trichoderma</i> sp.	Não informado	Patos de Minas, MG	08/11/2005
LQC 105	<i>Trichoderma</i> sp.	Não informado	Patos de Minas, MG	08/11/2005
LQC 129	<i>Botrytis cinerea</i>	Morango	Serra Negra, SP	15/06/2010

3.1.3 Meios de cultura utilizados

3.1.4 Batata Dextrose Agar + Benomyl e BDA + Oxygall

Os estudos com *C. rosea* foram desenvolvidos em meio de cultura BDA (item 3.1.2) + 0,002% benomyl com 25% de ingrediente ativo (Hi-yield Chemical, Bonham, TX). O benomyl foi utilizado para reduzir a velocidade de crescimento do tubo germinativo e por apresentar baixo efeito na germinação, prevenindo o rápido crescimento do tubo germinativo e, conseqüentemente, diminuindo a sobreposição de micélio podendo se monitorar a germinação por maior tempo (MILNER; HUPPATZ; SWARIS, 1991). Assim, uma alíquota de 7 ml de meio foi distribuído em placas de Petri (60 × 10 mm) para posterior

utilização nos ensaios. Para os isolados de *Trichoderma*, por serem altamente sensíveis ao benomyl, foi utilizado o redutor de colônia Oxygall (Difco ingrediente ativo 50%). O meio de cultura continha BDA (item 3.1.2) + 0,001% de Oxygall. O Oxygall restringe o crescimento de colônias de fungos.

3.1.5 Paraquat-Clorofenicol-Ágar (PCA)

Para os testes com discos de folha foi utilizado o meio Paraquat-Clorofenicol-Ágar (PCA). O preparo do meio consiste em adicionar 6 g de ágar em 500 ml de água destilada, autoclavar por 15 min e após resfriamento do meio adiciona-se 0,1 g de clorofenicol e 0,1 ml de Paraquat. O meio deve ser fortemente agitado e vertido em placas de Petri (poliestireno 100 × 10 mm).

3.1.6 Germinação relativa

A germinação foi calculada utilizando a equação: GERMINAÇÃO RELATIVA = $(Gt/Gc) \times 100$; onde Gt é o número de conídios germinados de cada replicata exposta por um período de tempo t e Gc é o número de conídios germinados no controle.

3.1.7 Produção de *Clonostachys rosea*

Na produção de inóculo para os ensaios em campo foi utilizado o método de fermentação sólida em arroz sem casca. Após manter o arroz imerso por 12 h em água (1 kg de arroz sem casca imerso em 1 l de água destilada); porções de 500 g de arroz foram distribuídas em sacos de polipropileno (50 × 30 cm) e autoclavadas por 30 min. Após o resfriamento, cada saco recebeu uma suspensão de 10 ml de *C. rosea* (10^7 conídios ml^{-1}) com auxílio de seringa

descartável. Os sacos foram mantidos em câmaras de crescimento (25 °C, 12 h de fotoperíodo) por 15 dias. Subseqüentemente, cada saco recebeu uma janela de papel absorvente para secagem do meio e maturação dos conídios (MORANDI et al., 2000). Após quinze dias de crescimento a cultura foi armazenada em refrigerador.

3.1.8 Câmara de radiação UV-B

A câmara de radiação UV-B foi montada em uma sala climatizada (25 ± 2 °C). Foi utilizada uma estrutura metálica de $2 \times 0,4 \times 1,5$ m, onde no topo da câmara foram fixadas quatro lâmpadas fluorescentes UV-B 313EL (Q-lab Cleveland, OH) a 45 cm de altura da base da câmara. Cada lâmpada foi coberta com um filtro de acetato de celulose de 0,1 mm de espessura (Málaga, SP, Brasil) com a função de permitir a passagem da radiação ultravioleta (290 – 400 nm) e não permitir a passagem da radiação UV-C e espectros de UV-B que não incidem na Terra (280 – 290 nm). Durante a execução dos ensaios foram realizadas avaliações periódicas na câmara de radiação UV-B para determinar os comprimentos de ondas. A cada ensaio, os filtros das lâmpadas foram trocados para evitar perdas na qualidade da radiação UV-B incidentes sobre as placas.

A irradiância de toda a superfície da base da câmara foi calculada com o auxílio de um espectroradiômetro (Ocean Optics modelo USB2000 + rad) com medições em 28 pontos equidistantes de dez centímetros em uma área útil de 40×70 cm (280 cm²) (Figura 1 A, B).

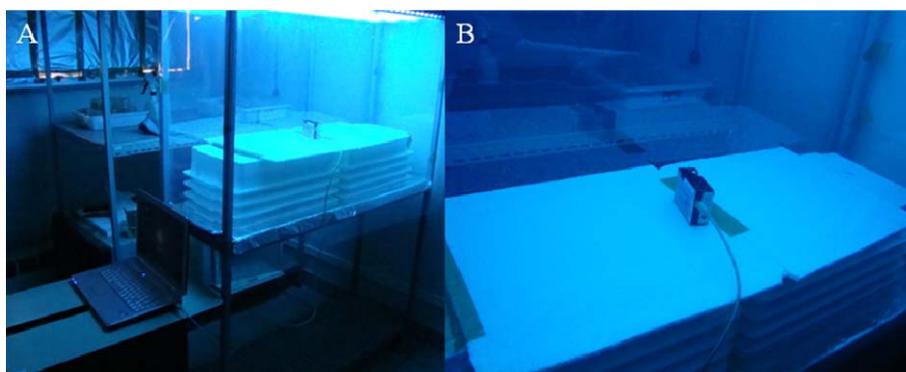


Figura 1 Câmara de UV-B; A) Vista da câmara de UV-B. B) câmara com o espectroradiômetro

A irradiância média no interior da câmara foi de 600 mW m^{-2} (Gráfico 1 A) calculada seguindo o método de Quate, Sutherland e Sutherland (1992). A energia da câmara foi de, aproximadamente, $2,1 \text{ kJ m}^{-2}$ por hora. As placas de Petri dos ensaios foram casualizadas em intervalos de trinta minutos para homogeneizar as doses recebidas de radiação UV-B.

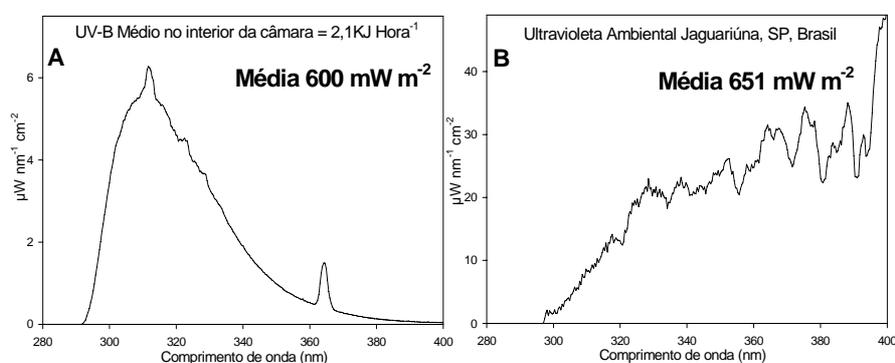


Gráfico 1 Irradiâncias aferidas com o espectroradiômetro; A) Irradiância média no interior da câmara de UV-B; B) Maior radiação ultravioleta registrada no período do ensaio realizado ao meio dia sobre dia sem nuvens

3.1.9 Ensaio de campo

O ensaio de campo foi numa área cercada de 30 × 40 m. Nessa área foram construídas nove parcelas com 8,5 m² de área útil, sendo em cada parcela alocadas estruturas metálicas de 2 m largura × 3 m comprimento × 2 m altura. Foram realizados três tratamentos sendo: 1) UV-B aumentado - estruturas contendo oito lâmpadas fluorescentes UV-B 313EL (Q-lab Cleveland, OH) que emitem radiação no comprimento de onda UV-B (290 – 315 nm) e UV-A (315 - 400 nm) cobertas com filme de acetato de celulose de 0,1 mm de espessura (Málaga, SP, Brasil) que foram trocados diariamente; 2) UV-B diminuído - filtro de poliéster (Metalgamica, SP, Brasil) capaz de filtrar a radiação UV-B ambiental cobrindo toda a parcela; e 3) UV-B ambiente - apenas com a presença das estruturas metálicas, radiação solar ambiente recebida em Jaguariúna, SP (Altitude 584 m, latitude 22°42'20"Sul e longitude 46°59'09" Oeste). Maior radiação ultravioleta registrada no período do ensaio (Gráfico 1 B).

As armações dispõem de roldanas que suspendem o suporte das lâmpadas mantendo uma distância constante de 30 cm do dossel das plantas. O delineamento experimental foi em blocos casualizados com três repetições (Figura 2).

As radiações UV-B/UV-A no campo foram medidas com auxílio do espectroradiômetro (Ocean Optics® modelo USB2000 + rad) e as lâmpadas das parcelas com radiação UV-B aumentado forneciam 255 mW m⁻² em média de radiação. As lâmpadas foram, em todos os ensaios, acesas das 9 h às 17 h. Nas parcelas com UV-B diminuído foram realizadas medições, durante o decorrer do dia e observado se o filtro retinha entre 75 - 80% da radiação ultravioleta ambiental, segundo o método de (QUAITE; SUTHERLAND; SUTHERLAND, 1992).



Figura 2 Vista do ensaio em campo

3.1.10 Análise dos resultados

Para a análise dos resultados, foi utilizado o pacote estatístico SAS e o software SigmaPlot. Dados de crescimento dos fungos e da intensidade de doença foram analisados por análise de variância (ANOVA) e os tratamentos comparados pelo teste de Tukey ou pLSD. Outras análises foram realizadas conforme a necessidade.

3.2 Detalhes dos ensaios realizados

Abaixo segue todas as metodologias utilizadas para o desenvolvimento dos ensaios em laboratório e campo realizados com radiação UV-B.

3.2.1 Sensibilidade da germinação de conídios de *Trichoderma* sp. e de *C. rosea* à radiação UV-B

Inicialmente foi estudada a sensibilidade da germinação de conídios dos fungos em meio de cultura BDA (item 3.1.4), expostos a diferentes quantidades de radiação UV-B por 2 horas. O ensaio consistiu em expor os conídios dos fungos (concentração de 10^5 conídios m^{-1}) a 18 cm, 28 cm e 48 cm de distância das lâmpadas emissoras da radiação UV-B (Figura 3), sendo as irradiâncias

médias de 823, 600 e 222 mW m⁻², respectivamente. Ao final do ensaio cada valor correspondeu a doses de 1,6; 4,2 e 5,9 kJ m⁻², respectivamente. A germinação dos conídios radiados foi determinada 24 e 36 h após a exposição e, neste período, os esporos foram incubados a 25 ± 2 °C, no escuro. O isolado de *Trichoderma* (LQC 107) e de *C. rosea* (LQC 62) foi utilizado neste ensaio. O ensaio foi repetido três vezes e cada repetição teve duas placas como replicas.



Figura 3 Esquema do ensaio para avaliar a sensibilidade dos conídios de *Trichoderma* e de *Clonostachys rosea* à radiação UV-B

3.2.2 Estabelecimento do período adequado de incubação dos conídios para avaliar a germinação

O objetivo deste ensaio foi estabelecer o melhor tempo de incubação após exposição ou não à radiação UV-B para realizar os estudos sobre conídios germinados sem estes se sobreporem.

Conídios (concentração de 10⁵ conídios m⁻¹) dos isolados LQC 107 de *Trichoderma* e LQC 62 de *C. rosea*, contidos em placas de Petri com BDA (item 3.1.4) foram expostas ou não em câmara de radiação UV-B por 2 horas,

conforme descrito no item 3.2.1 e incubadas a câmaras de crescimento (25 ± 1 °C no escuro).

A determinação da germinação dos conídios foi iniciada após 8 horas de incubação e, posteriormente, a cada 4 horas foram retiradas duas placas de Petri para avaliação da germinação dos conídios e, assim, sucessivamente até 24 h. Para o ensaio foram preparadas as suspensões dos dois agentes, (item 3.1.3) e transferidas para 36 placas de Petri (item 3.1.4) para cada isolado. Transcorridos os tempos de incubação, os esporos foram corados com lactofenol (0,05% azul de tripan) e observada a germinação de 300 conídios com auxílio de microscópio de luz em aumento de 400 vezes. Para ser considerado germinado, o conídio necessitava apresentar tubo germinativo maior que o seu próprio tamanho (BRAGA et al., 2001a; MILNER; HUPPATZ; SWARIS, 1991). O ensaio foi repetido três vezes e cada repetição teve duas placas como réplicas.

3.2.3 Seleção de isolados tolerantes à radiação UV-B

Para este ensaio foram utilizados dez isolados de *Trichoderma* spp. e oito de *C. rosea* (Tabela 1). Uma suspensão de conídios de cada isolado foi preparada na concentração de 10^5 conídios/ml e pipetada no centro de placas de Petri contendo meio de cultura (item 3.1.4). Os esporos do tratamento testemunha (não irradiados) tiveram as placas envoltas em papel alumínio para evitar a radiação, mas também foram levadas à câmara de UV-B. Os conídios dos tratamentos irradiados tiveram as tampas das placas abertas no interior da câmara de radiação UV-B e foram expostas por um período de 2 h (item 3.1.7). Após a irradiação as placas foram mantidas em câmara de crescimento (25 ± 1 °C) no escuro até a avaliação da germinação seguindo os tempos observados no item 3.2.2. O ensaio foi repetido três vezes e cada repetição teve duas placas como réplicas.

3.2.4 Curva de sobrevivência de *C. rosea* e *Trichoderma* submetidos à radiação UV-B

Para o estabelecimento da curva de sobrevivência, foram utilizados os isolados LQC 62 de *C. rosea* e LQC 96 de *Trichoderma*. As placas contendo os conídios no meio de cultura (item 3.1.4) foram expostas à radiação UV-B por períodos de tempo variando de 0 (não irradiada) a 1, 2, 3, 4, 5 e 6 h (item 3.1.7). As placas não irradiadas (envoltas em papel alumínio) ficaram o tempo todo no interior da câmara de UV-B até a sexta hora. As doses correspondentes por tempo são: 0, 2,1; 4,2; 6,3; 8,4; 10,5; 12,6 kJ. Depois da radiação as placas foram mantidas em câmaras de crescimento (25 ± 1 °C) no escuro para posterior avaliação da germinação. O ensaio foi repetido três vezes e cada repetição teve duas placas como réplicas.

3.2.5 Sensibilidade dos conídios de *C. rosea* e *Trichoderma* em diversos estádios de germinação à radiação UV-B

Suspensões dos isolados de *C. rosea* (LQC 62) e *Trichoderma* spp. (LQC 96) foram transferidas para placas de Petri, contendo meio de cultura (item 3.1.4) e incubadas em câmara de crescimento (25 ± 1 °C) no escuro por períodos de 0, 2, 4, 6 e 8 h. Ao final desses períodos as placas foram colocadas por 2 h em câmara de radiação UV-B (item 3.1.7), recebendo a dose única de 4,2 kJ m⁻². Dessa forma, foi analisado o comportamento dos conídios dos antagonistas em diferentes estádios de desenvolvimento quando submetidos à radiação UV-B. Depois da radiação as placas foram mantidas em câmaras de crescimento (25 ± 1 °C) no escuro para posterior avaliação da germinação relativa que seguiu os tempos do ensaio 3.2.2. O ensaio foi repetido três vezes e cada repetição teve duas placas como réplicas.

3.2.6 Germinação de esporos e colonização de discos de folha por *C. rosea*

Após os ensaios, utilizando meio de cultura, foi proposto utilizar um teste envolvendo radiação de UV-B sobre discos de folha, onde é aproveitada a característica que *C. rosea* apresenta de crescer endofiticamente sobre tecido senescente do hospedeiro sem causar nenhuma lesão na planta.

Para este ensaio foi utilizada a metodologia proposta por Morandi et al. (2000), na qual discos de folha de feijoeiro (cv talismã, 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 (19 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 10⁷ conídios ml⁻¹ do antagonista. Os discos foram expostos à radiação UV-B por 0, 1, 2, 3, 4 e 5 h (item 3.1.7). A testemunha foi envolvida em papel alumínio e mantida no interior da câmara de UV-B por toda duração do ensaio. Após exposição os discos foram transferidos para placas contendo o meio PCA (item 3.1.4).

Nos discos foi avaliada a germinação dos conídios, a colonização e esporulação do fungo no tecido do hospedeiro. Para estimar a germinação dos conídios de *C. rosea*, quatro discos de folha por tratamento foram colocados sobre laminas contendo lactofenol (azul tripan 0,05%) aquecido rapidamente para clareamento e posterior observação em microscópio (SAHA; JACKSON; JOHNSON-CICALESE, 1988). Foi avaliada a germinação de 100 conídios por disco, sendo com 24 h para a testemunha e 36 horas para as radiadas com UV-B.

Para avaliar a colonização de *C. rosea*, foi utilizado o método de esporulação do antagonista em tecido do hospedeiro. Cada tratamento constituiu

de três placas contendo dez discos cada. As placas foram mantidas em BOD a 25 °C por 10 dias sendo os discos avaliados no terceiro, sétimo e décimo dia. A avaliação foi realizada seguindo o método de Morandi et al. (2000) que consiste em escalas de notas que variam de acordo com o crescimento do antagonista sobre o tecido foliar com conidióforos: 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 %). O ensaio foi repetido por três vezes e cada repetição teve três placas como replicatas.

3.2.7 Sobrevivência de *C. rosea* em discos de folha sob diversos tempos de exposição à radiação UV-B

Neste estudo foi utilizada a mesma metodologia descrita anteriormente (item 3.2.6) Entretanto, as doses de radiação UV-B foram de 0, 1, 2 e 3 h. Nesse ensaio, também, foram utilizadas quatro concentrações de *C. rosea* (10^6 , 10^5 , 10^4 e 10^3 conídios ml^{-1}) em folhas de feijoeiro (cv talismã, de 30 a 60 dias de idade). O ensaio foi repetido por três vezes e cada repetição teve 3 placas como replicatas.

3.2.8 Efeito da radiação UV-B sobre a capacidade antagônica de *C. rosea* a *B. cinerea*

Este ensaio segue toda a metodologia descrita no item 3.2.6. Entretanto, aqui as doses de UV-B foram 0, 1, 2 e 3 h. Nesse ensaio, também, variaram as concentrações de *C. rosea*, sendo utilizados 10^6 , 10^5 e 10^4 conídios ml^{-1} . Todas as avaliações para *C. rosea* seguiram as metodologias descritas no item 3.2.6. Neste ensaio foram utilizadas folhas de morangueiro (cv Caminho Real, entre 30 a 90 dias de idade), os conídios de *C. rosea* receberem a radiação UV-B e, logo

em seguida, para ver a capacidade antagônica uma alíquota de 10 µl (10^5 conídios ml^{-1}) de um isolado de *B. cinerea* (LQC 129) foi utilizado para se fazer o teste de antagonismo. O teste de antagonismo seguiu a metodologia de Peng e Sutton (1991) onde notas são 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.

3.2.9 Efeito da radiação ultravioleta-B na sobrevivência de *C. rosea* em condições de campo

O ensaio foi realizado na área experimental da Embrapa Meio Ambiente (item 3.1.8). O ensaio foi realizado aplicando *C. rosea* (LQC62) proveniente do arroz (item 3.1.6) pulverizado, às 8 h da manhã, sobre plantas de feijão (10^7 conídios ml^{-1} , volume de calda de 1 l/10 m^2). Discos de folhas foram coletados periodicamente (3, 4, 5 e 9 h após aplicação e toda manhã até o quinto dia). A germinação dos conídios e a capacidade do fungo em colonizar e esporular sobre os discos de folhas (item 3.2.6) foram avaliados.

3.2.10 Efeito da radiação ultravioleta-B no estabelecimento de *C. rosea* em condições de campo

O ensaio foi realizado na área experimental da Embrapa Meio Ambiente (item 3.1.8). O ensaio foi realizado aplicando *C. rosea* (LQC62), proveniente do arroz (item 3.1.6), pulverizado, às 18 h, sobre plantas de feijão na concentração de 10^7 conídios ml^{-1} e volume de calda de 1 l/10 m^2). Discos de folhas foram coletados, periodicamente e após 0, 14, 15,5, 16,5, 17 e 21 h depois da

pulverização e toda manhã até o quinto dia. A avaliação foi realizada determinando-se a germinação dos conídios e a capacidade do fungo em colonizar e esporular sobre os discos de folhas (item 3.2.6).

3.2.11 Comparação entre os ensaios de sobrevivência e estabelecimento de *C. rosea*

Foram realizadas comparações sobre o crescimento e desenvolvimento de *C. rosea* em campo com base nos ensaios de sobrevivência (item 3.2.9) e estabelecimento (item 3.2.10) realizados na área experimental (item 3.1.8).

4 RESULTADOS

4.1 Sensibilidade da germinação de esporos de *Trichoderma* sp. e de *C. rosea* à radiação UV-B

A radiação UV-B reduziu a velocidade de germinação dos esporos dos antagonistas. Quanto mais próximo das lâmpadas emissoras da radiação UV-B, menor a germinação de esporos de *C. rosea* (Gráfico 2 A) e de *Trichoderma* sp. (Gráfico 2 B). Nas menores irradiâncias (222 mW/m^{-2}) a germinação dos fungos ocorreu nas primeiras 12 e 24 h. Por outro lado, na maior irradiância (823 mW/m^{-2}) a germinação foi praticamente nula nas primeiras 12 e 24 h e ocorreu pequena germinação após 36 h (Gráfico 2). Nas irradiâncias menores não foi observada germinação após 36 h de incubação, pois, os tubos germinativos cresceram abundantemente neste período impossibilitando a contagem.

Com os resultados foi decidido trabalhar apenas com a irradiância média (600 mW/m^{-2}) onde foi utilizado para todos os ensaios subsequentes (item 3.1.7).

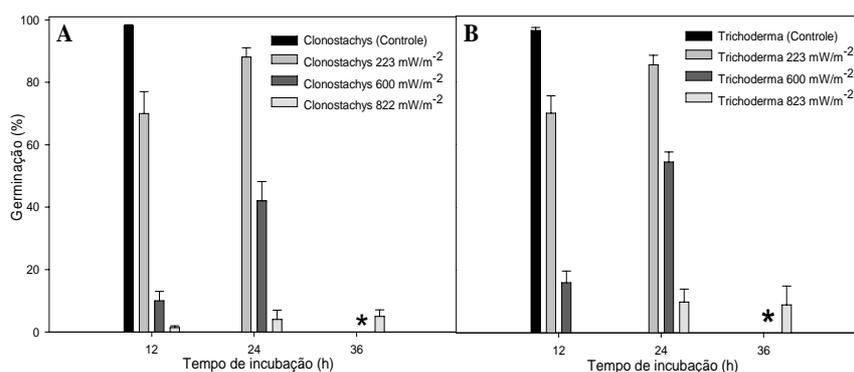


Gráfico 2 Sensibilidade da germinação de esporos à diferentes doses de radiação UV-B; A) *Clonostachys rosea*; B) *Trichoderma*
* Germinação excessiva impossibilitando contagem

4.2 Estabelecimento do período adequado de incubação dos conídios para avaliar a germinação

A germinação dos conídios de *C. rosea* foi de 98% no tratamento testemunha (sem exposição), após 12 h de incubação. Para esse antagonista, os esporos submetidos à radiação UV-B apresentaram 60% de germinação após 24 h (Gráfico 3 A). Para *Trichoderma* a testemunha apresentou 95% de germinação após 16 h de incubação e para os conídios irradiados foram necessárias 24 h de incubação para germinação de 60% dos conídios. Assim, esses tempos de incubação foram considerados adequados, pois, evita a sobreposição de micélio e permite uma avaliação mais precisa da germinação (Gráfico 3 B). Com isso ficou evidente o atraso da germinação dos conídios pela ação da radiação UV-B.

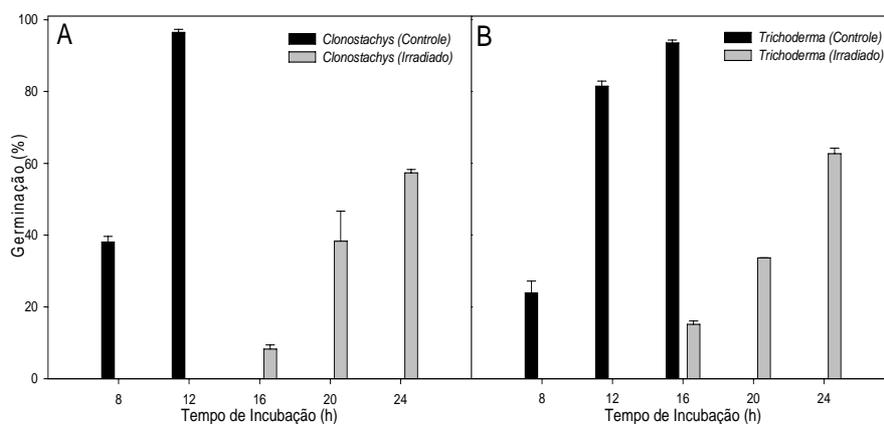


Gráfico 3 Período de incubação dos esporos A) *Clonostachys rosea* (LQC 62); B) *Trichoderma* (LQC 107) para avaliar a germinação Controle (barras negras) e com irradiação de UV-B (barras cinzas)

4.3 Seleção de isolados tolerantes à radiação UV-B

O isolado LQC 62 de *C. rosea* foi o mais tolerante, apresentando germinação relativa acima de 60%. Os isolados menos tolerantes foram LQC 87, LQC 60, LQC 111, LQC 58 e LQC 73 que apresentaram germinação relativa inferior a 10% (Gráfico 4 A). O isolado LQC 62 foi utilizado nos ensaios subsequentes por apresentar boa tolerância à radiação UV-B.

Para *Trichoderma* a germinação relativa variou de 75 a 60% e todos os isolados apresentaram uma tolerância muito próxima, não sendo possível selecionar o mais tolerante, O isolado LQC 105 foi o menos tolerante à radiação UV-B apresentando germinação relativa de, aproximadamente, 40% (Gráfico 4 B). O isolado LQC 96 foi utilizado nos ensaios subsequentes por apresentar boa tolerância à radiação UV-B, com germinação relativa superior a 70%.

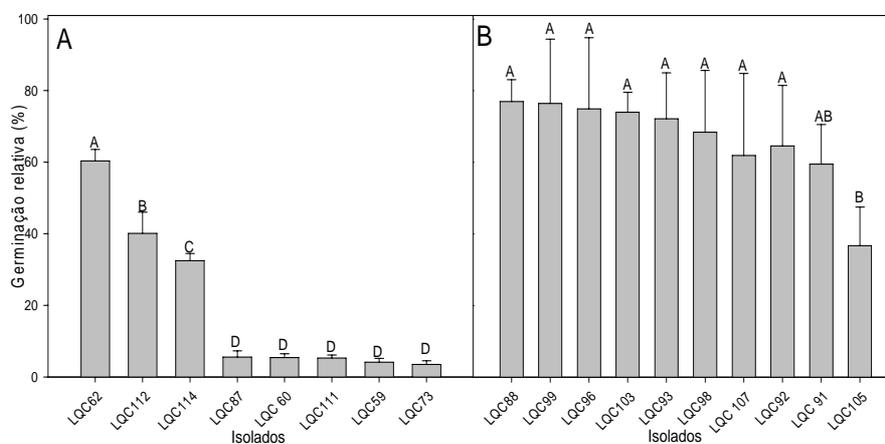


Gráfico 4 Germinação relativa (%) dos isolados; A) tolerância à radiação UV-B de *Clonostachys rosea*; B) *Trichoderma* spp.

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente pelo Teste Tukey (5%), barra de erro são desvio padrão de três repetições

4.4 Curva de sobrevivência de *C. rosea* e *Trichoderma* submetidos à radiação UV-B

Estudos de regressão mostraram que a dose letal cinquenta (DL₅₀) para o isolado LQC 62 de *C. rosea* foi de 4,1 kJ m⁻² de radiação UV-B e o microrganismo apresentou a dose letal cem (DL₁₀₀) em 7,1 kJ m⁻² de radiação UV-B (Gráfico 5 A).

O isolado LQC 96 de *Trichoderma* foi mais tolerante à radiação UV-B que o isolado de *C. rosea*. A regressão de *Trichoderma* spp. mostrou que a dose letal cinquenta (DL₅₀) foi de 4,9 kJ m⁻² de radiação UV-B e o microrganismo apresentou a dose letal cem (DL₁₀₀) em 8 kJ m⁻² de radiação UV-B (Gráfico 5 B).

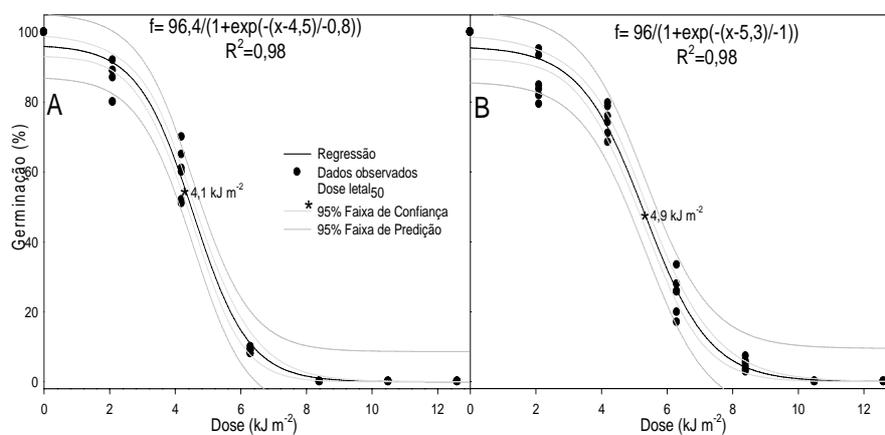


Gráfico 5 Regressão da curva de sobrevivência a radiação UV-B; A) *Clonostachys rosea* (LQC 62); B) *Trichoderma* (LQC 96)

4.5 Sensibilidade dos conídios de *C. rosea* e *Trichoderma* em diversos estádios de germinação à radiação UV-B

Os conídios se mostram menos resistentes à radiação UV-B quando mais avançada as fases de germinação. Os conídios na fase inicial de germinação foram mais resistentes à radiação UV-B. Para o isolado de *C. rosea* não foi possível evidenciar a germinação após 6 h de incubação (Gráfico 6 A). O isolado de *Trichoderma* não apresentou germinação após 8 h de incubação (Gráfico 6 B).

A DL₅₀, calculada por análise de regressão, para *C. rosea* foi de 1 h 49 min. de incubação e a DL₁₀₀ foi de 4 h 59 min. de incubação (Gráfico 6 A). A regressão mostrou que o tempo de incubação para *Trichoderma* foi de 3 h 15 min. para a DL₅₀ e 5 h 49 min. para a DL₁₀₀ (Gráfico 6 B). Para o isolado LQC 96 de *Trichoderma*, foi possível observar maior resistência dos conídios em períodos de incubação que o isolado LQC 62 de *C. rosea*.

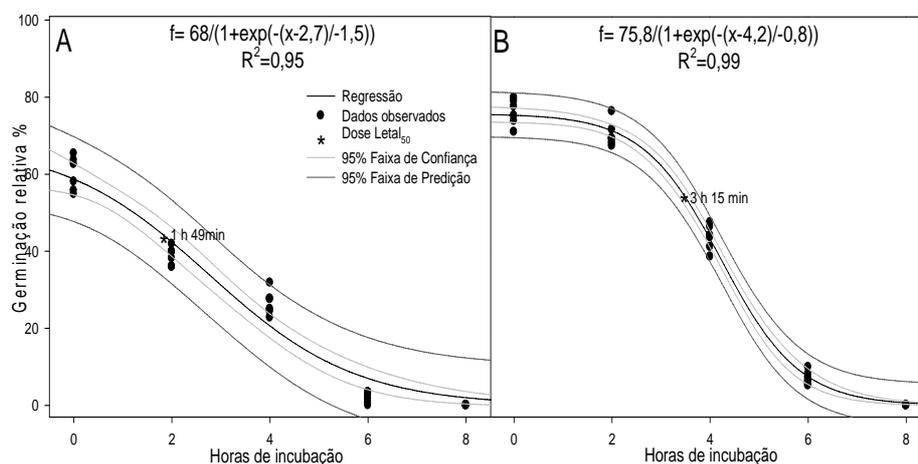


Gráfico 6 Sensibilidade dos esporos em diversos estádios de germinação ao UV-B; A) *Clonostachys rosea* (LQC 62). B) *Trichoderma* (LQC 96)

4.6 Germinação de esporos e colonização de discos de folha por *C. rosea*

No teste de germinação de esporos do agente de controle biológico foi observada uma redução da germinação no período de exposição à radiação UV-B (Gráfico 7). Entretanto, essa diminuição foi menos acentuada quando comparada com o ensaio em meio de cultura artificial (item 4.4; Gráfico 5 A) e, também, foi possível observar que não ocorreu a morte total dos conídios, mostrando, assim, que o ambiente foliar apresentou certa proteção aos conídios. A DL_{50} foi de 3 h 7 min.

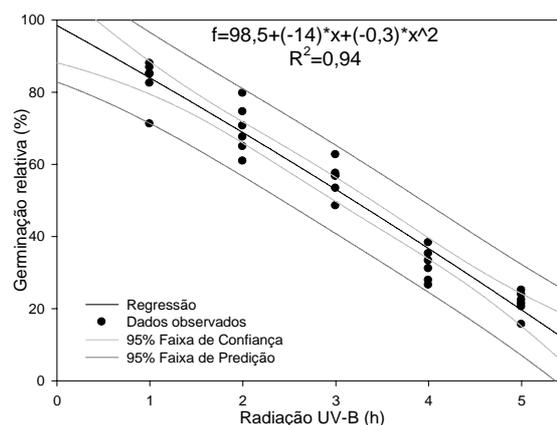


Gráfico 7 Germinação relativa de esporos de *Clonostachys rosea* em disco de folha expostos à radiação UV-B

Outra observação importante é que o crescimento de *C. rosea* foi reduzido inicialmente quando recebeu radiação UV-B (terceiro dia). Porém, o crescimento foi similar com o controle no sétimo e décimo dia de incubação em meio PCA (Gráfico 8 A, B). Nota-se que a presença do fungo foi de 100% nos discos de folhas avaliadas até o final do ensaio.

Na avaliação da porcentagem de área foliar colonizada por *C. rosea* foi observado que a testemunha foi a que apresentou maior crescimento durante avaliação no terceiro dia, destacando-se de todos os outros tratamentos. Entretanto, novamente essa colonização foi se igualando ao longo do tempo de incubação (Gráfico 8 B).

Nesse ensaio foi observado um crescimento reduzido de *C. rosea* quando este foi irradiado. Entretanto, até 5 h de radiação UV-B não ocorreu a inviabilização do crescimento do fungo sobre os discos de folha (Gráfico 8 A, B).

A taxa de progresso da colonização de *C. rosea* foi alterada apenas na avaliação do terceiro dia (Gráfico 9) não sendo possível observar diferença nas taxas de progressos nas outras avaliações. Isso mostra que a radiação UV-B causou um atraso inicial sobre a taxa de progresso da colonização e, conseqüentemente, no crescimento de *C. rosea*.

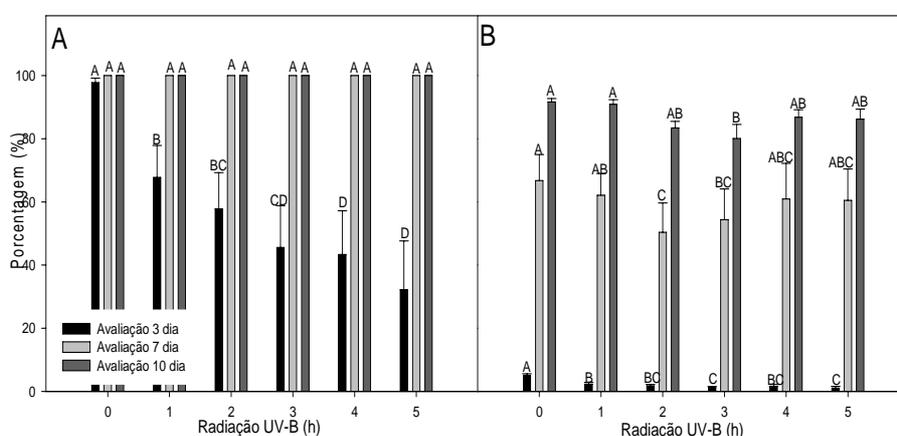


Gráfico 8 Teste de colonização; A) Presença de *C. rosea* sobre os discos; B) Crescimento médio de *Clonostachys rosea* por disco
Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente pelo Teste Tukey (5%), barra de erro são desvio padrão de nove repetições

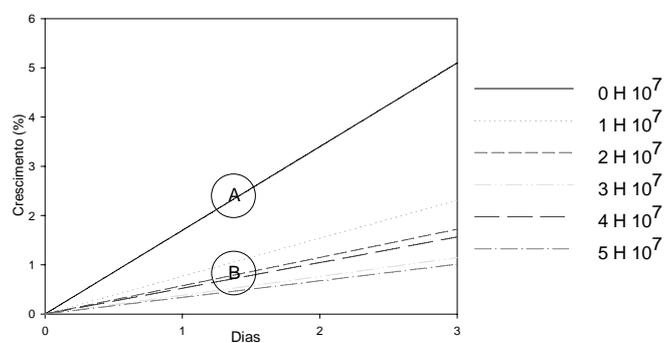


Gráfico 9 Taxa do progresso da colonização de discos por *Clonostachys rosea* no terceiro dia da avaliação
Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente pelo Teste Tukey (5%)

4.7 Sobrevivência de *C. rosea* em discos de folha sob diversos tempos de exposição à radiação UV-B

Houve interação significativa da concentração de conídios com tempo de exposição de radiação UV-B sobre o crescimento e desenvolvimento de *C. rosea* nos discos de folha. Foi observado que quanto maior a concentração de conídios utilizados ocorreu maior crescimento do fungo. Além disso, quanto menor a radiação UV-B maior a área abaixo da curva do progresso da presença de *C. rosea* (AACPPC) (Gráfico 10 A) e maior área abaixo da curva do progresso da colonização de *C. rosea* (AACPCC) (Gráfico 10 B).

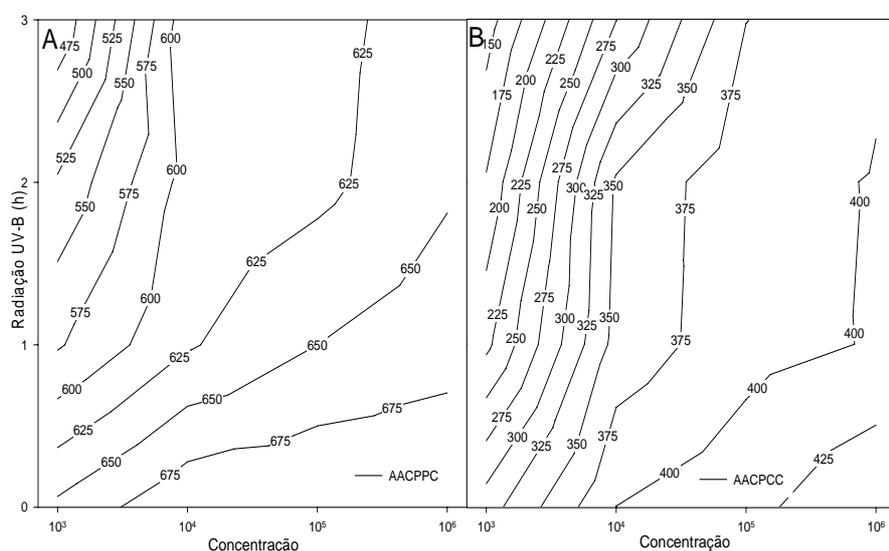


Gráfico 10 Teste de colonização; A) Área abaixo da curva de progresso da presença de *Clonostachys rosea* (AACPPC) em discos de folhas de feijoeiro B) Área abaixo da curva de progresso do crescimento de *Clonostachys rosea* (AACPCC)

Apesar de ocorrer redução do crescimento proporcionado pela radiação UV-B, entretanto, independente da dose de UV-B e concentração de conídios utilizados houve crescimento de *C. rosea* (Gráfico 11 A, B, C, D).

Nas avaliações do terceiro e sétimo dia, assim como no ensaio anterior (item 4.3.6), foi observada uma taxa de progresso do crescimento estatisticamente maior nos discos onde não houve tratamento com radiação UV-B e nas maiores concentrações utilizadas (Gráfico 12 A, B).

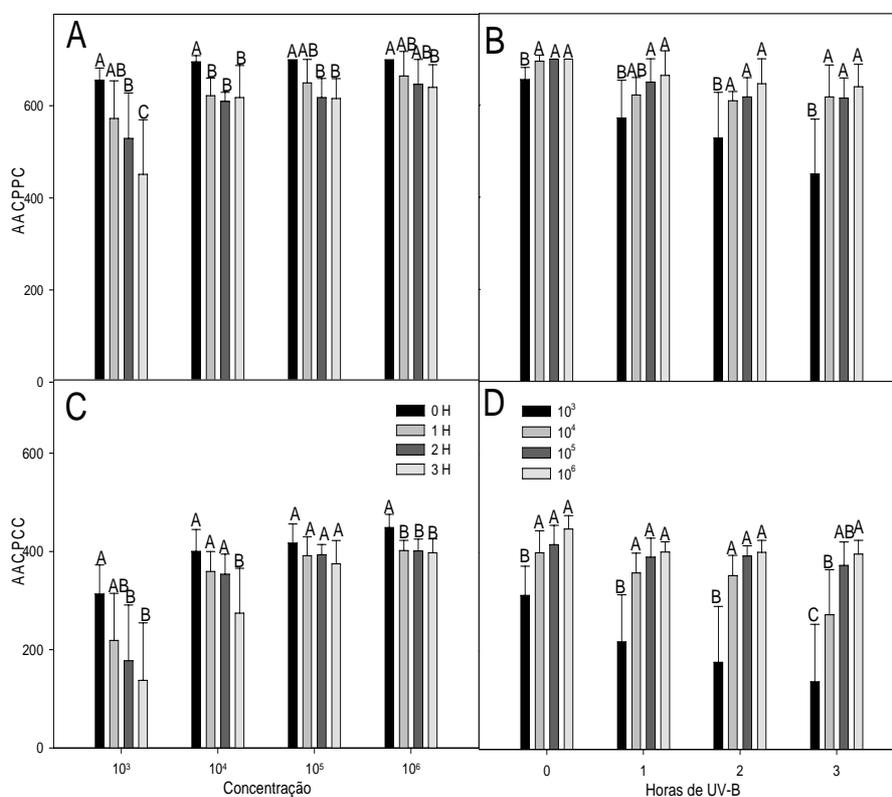


Gráfico 11 Teste de colonização; A) Área abaixo da curva de progresso da presença de *Clonostachys rosea* (AACPPC) sobre as diferentes concentrações de esporos B) Área abaixo da curva de progresso da presença de *Clonostachys rosea* (AACPPC) sobre as diferentes horas de radiação UV-B (AACPPC) C) Área abaixo da curva de progresso do crescimento de *Clonostachys rosea* (AACPCC) sobre as diferentes concentrações; D) Área abaixo da curva de progresso do crescimento de *Clonostachys rosea* (AACPCC) sobre as diferentes horas de radiação UV-B

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente pelo Teste Tukey (5%), barra de erro são desvio padrão de nove repetições

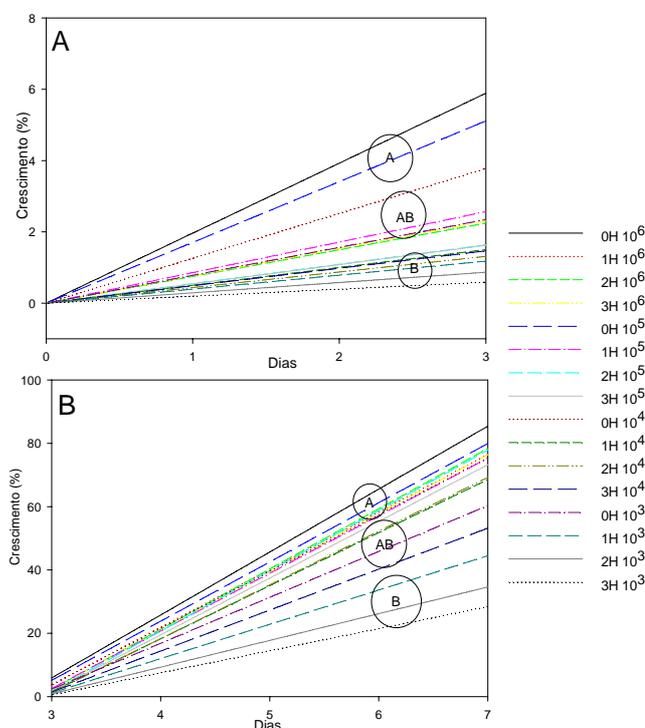


Gráfico 12 Taxa de progresso do crescimento de *Clonostachys rosea*; A) terceiro dia; B) sétimo dia

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas dentro dos círculos não diferem significativamente pelo Teste Tukey (5%)

4.8 Efeito da radiação UV-B sobre a capacidade antagônica de *C. rosea* em *B. cinerea*

Neste teste ficou evidente que menores concentrações do antagonista e maior tempo de irradiação UV-B reduziram AACPPC e da AACPCC (Gráfico 13 A, B). Ao mesmo tempo foi visto que quanto menores as concentrações de conídios de *C. rosea* e maiores as doses de radiação UV-B propiciaram um aumento da AACPPB e AACPCB em *B. cinerea* (Gráfico 13 C, D). Porém, nesse ensaio não houve interação significativa do tempo de irradiação UV-B

com concentração de conídios de *C. rosea*. A concentração influenciou bastante no crescimento de *C. rosea* (Gráfico 14 A, B, C, D) e no antagonismo a *B. cinerea* (Gráfico 13 A, B, C, D). Entretanto, o tempo de irradiação UV-B não interferiu, significativamente, no crescimento de *C. rosea* e, conseqüentemente, no antagonismo a *B. cinerea*. Apenas a concentração 10^4 sofreu influência das horas de radiação UV-B (Gráfico 15 A, B, C, D).

A taxa de progresso do crescimento de *C. rosea* apresentou diferença significativa apenas no terceiro e sétimo dia (Gráfico 16 A, B). A taxa de progresso do crescimento de *B. cinerea* apresentou diferença significativa apenas no sétimo dia e na média do ensaio (Gráfico 17 A, B). As menores concentrações de *C. rosea* promoveram a taxa de progresso do crescimento mais acelerada de *B. cinerea*.

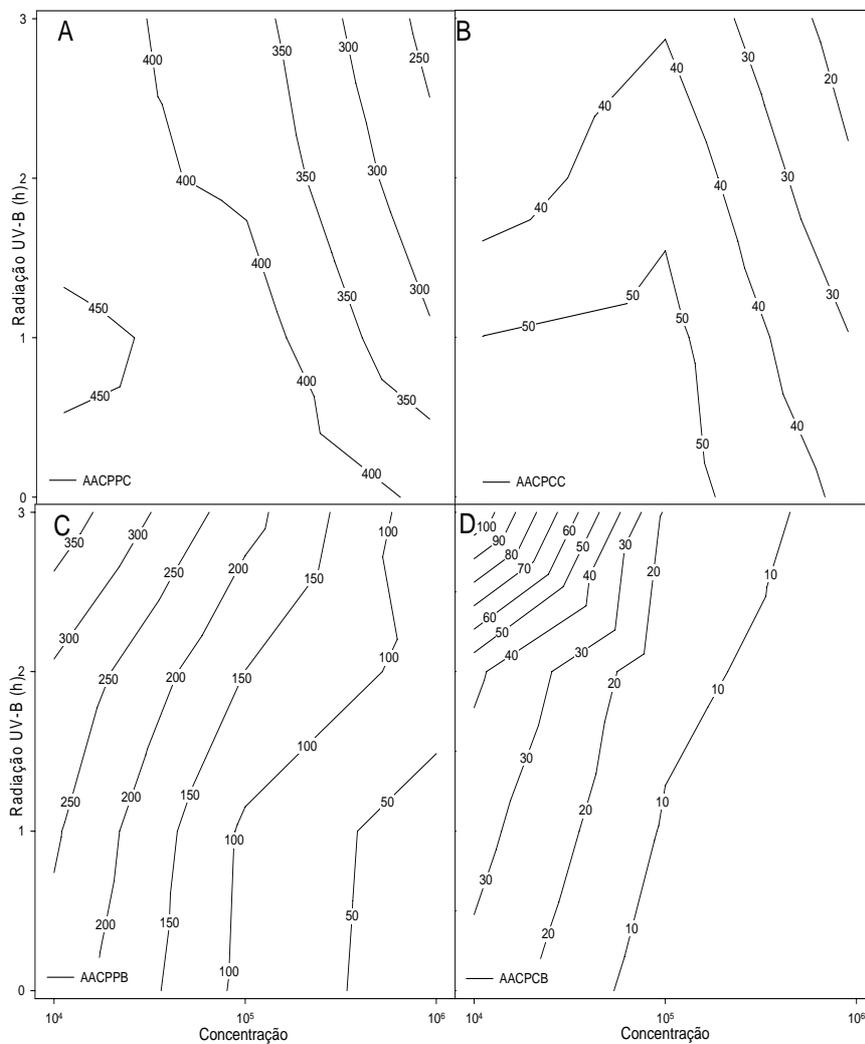


Gráfico 13 Teste de colonização; A) Área abaixo da curva de progresso da presença de *Clonostachys rosea* (AACPPC); B) Área abaixo da curva de progresso do crescimento de *Clonostachys rosea* (AACPCC); C) Área abaixo da curva de progresso da presença de *Botrytis cinerea* (AACPPB); D) Área abaixo da curva de progresso do crescimento de *Botrytis cinerea* (AACPCB)

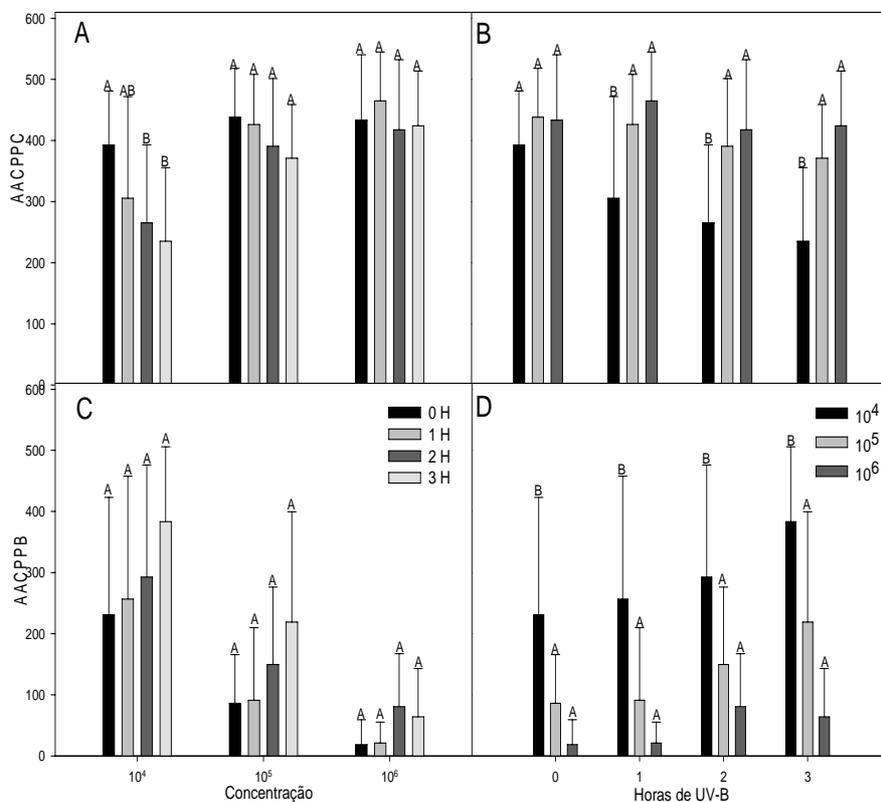


Gráfico 14 Teste de colonização; A) Área abaixo da curva de progresso da presença de *Clonostachys rosea* (AACPPC) sobre as diferentes concentrações; B) Área abaixo da curva de progresso da presença de *Clonostachys rosea* (AACPPC) sobre os diferentes tempos de radiação UV-B; C) Área abaixo da curva de progresso da presença de *Botrytis cinerea* (AACPPB) pelas diferentes concentrações; D) Área abaixo da curva de progresso da presença de *Botrytis cinerea* (AACPPB) pelos diferentes tempos de radiação UV-B. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente pelo Teste Tukey (5%)

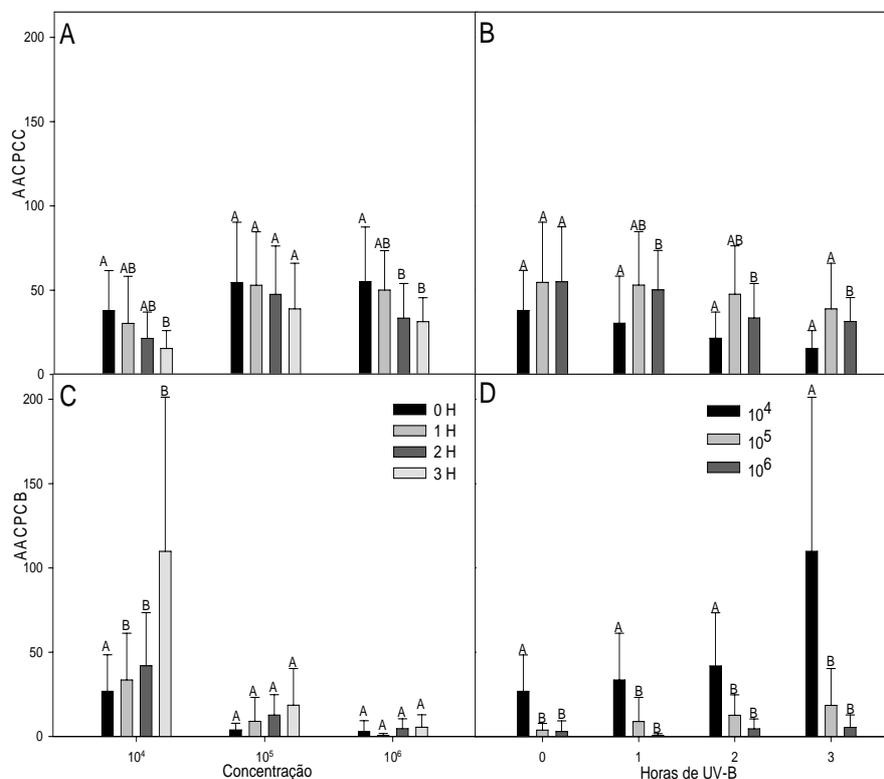
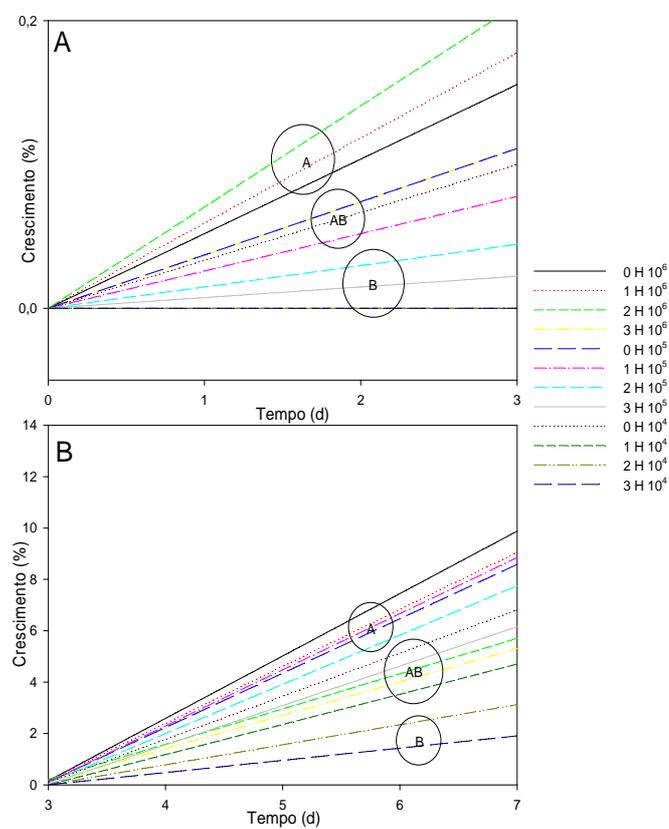


Gráfico 15 Teste de colonização; A) Área abaixo da curva de progresso de crescimento de *Clonostachys rosea* (AACPCC) sobre as diferentes concentrações; B) Área abaixo da curva de progresso do crescimento de *Clonostachys rosea* (AACPCC) sobre os diferentes tempos de radiação UV-B; C) Área abaixo da curva de progresso do crescimento de *Botrytis cinerea* (AACPCB) pelas diferentes concentrações; D) Área abaixo da curva de progresso do crescimento de *Botrytis cinerea* (AACPCB) pelos diferentes tempos de radiação UV-B

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente pelo Teste Tukey (5%)



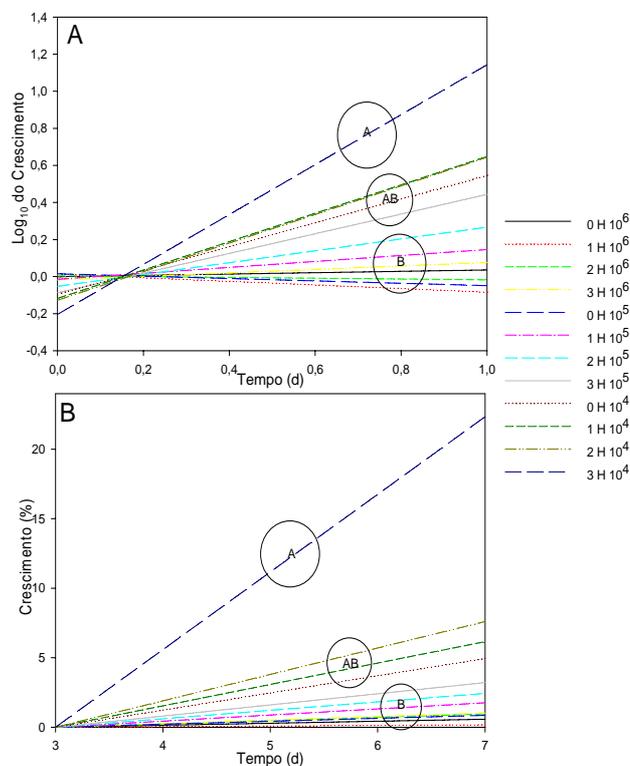


Gráfico 17 Taxa de progresso do crescimento de *Botrytis cinérea* sobre diferentes concentrações de *Clonostachys rosea*; A) Média do ensaio B) taxa de progresso do crescimento de *Botrytis cinérea* no sétimo dia sobre diferentes concentrações de *Clonostachys rosea*. Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas dentro dos círculos não diferem significativamente pelo Teste Tukey (5%)

4.9 Efeito da radiação ultravioleta-B na sobrevivência de *C. rosea* em condições de campo

No ensaio do estabelecimento de *C. rosea*, quando observado os dados da germinação foi visto que não houve efeito significativo na germinação, fato

esse que se deve aos conídios que não foram expostos à radiação UV-B, pois, a aplicação foi no final do dia (Gráfico 18).

Os tratamentos tiveram sempre a mesma tendência, porém, o tratamento com radiação UV-B apresentou uma redução na presença e no crescimento de *C. rosea* sempre mais acentuada (Gráfico 19 A, C). Analisando a AACPPC e a AACPCC confirma que o tratamento com radiação UV-B ambiente e radiação UV-B reduzido (315 -400 nm) apresentaram maior número de discos com o agente de biocontrole que o tratamento com UV-B aumentado, (Gráfico 19 B, D).

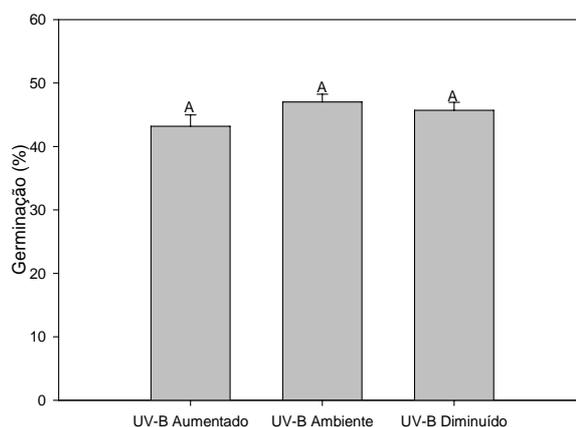


Gráfico 18 Efeito da radiação UV-B sobre a germinação de esporos de *Clonostachys rosea* nos tratamentos para avaliar a sua sobrevivência em condições de campo

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente pelo Teste Tukey (5%), barra de erro são desvio padrão de nove repetições

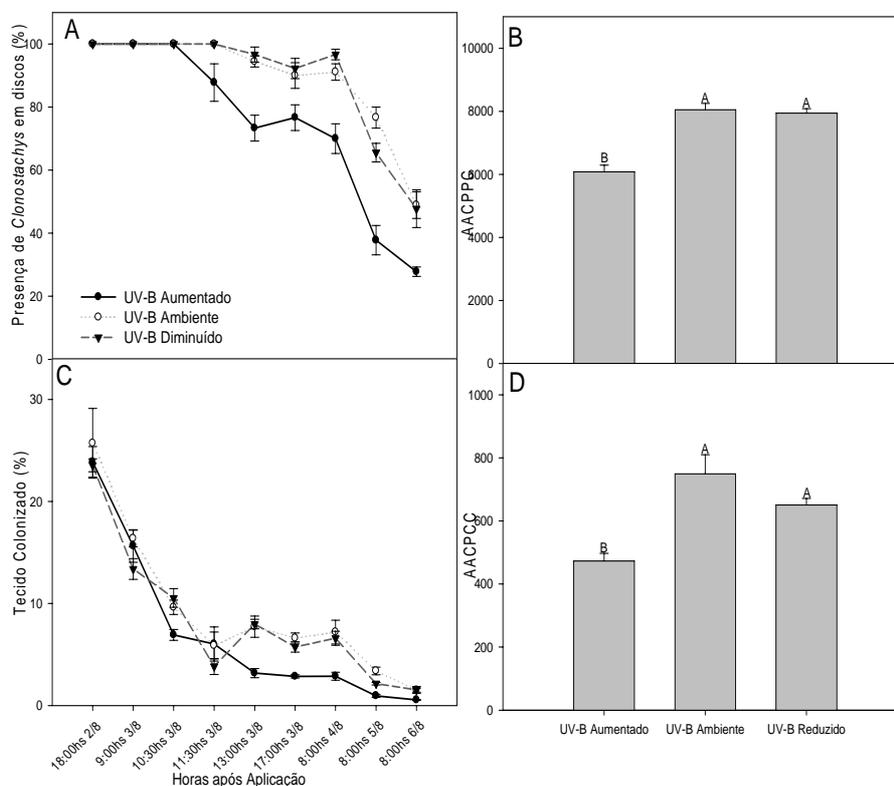


Gráfico 19 Teste de colonização; A) Presença de *Clonostachys rosea* (%) ao longo do ensaio; B) Área abaixo da curva de progresso da presença de *Clonostachys rosea* (AACPPC); C) Porcentagem de crescimento médio de *Clonostachys rosea* ao longo do ensaio; D) Área abaixo da curva de progresso do crescimento de *Clonostachys rosea* (AACPCC)

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente pelo Teste Tukey (5%), barra de erro são desvio padrão de nove repetições

4.10 Efeito da radiação ultravioleta-B no estabelecimento de *C. rosea* em condições de campo

Durante as horas mais quentes e, conseqüentemente, com maior incidência de radiação UV-B, a germinação em discos de folha, foi observado

um ligeiro aumento na germinação de *C. rosea* no tratamento UV-B Ambiente. Entretanto, esse aumento na germinação não se refletiu em aumento significativo na presença e no crescimento do agente de controle biológico (Gráfico 20 A, B).

No teste de colonização houve uma redução drástica da presença e no crescimento médio de *C. rosea* (Gráfico 21 A, C). Também foi possível evidenciar que todos os tratamentos seguiram sempre a mesma tendência, não apresentando, assim, aparentemente nenhuma diferença entre os tratamentos, porém, o tratamento com UV-B aumentado apresentou maior redução da presença e do crescimento sobre os discos de folha (Gráfico 21 A, C). Quando foi analisada a AACPPC e a AACPCC, foi observado novamente que o tratamento com radiação UV-B aumentado teve um menor desenvolvimento (Gráfico 21 B, D).

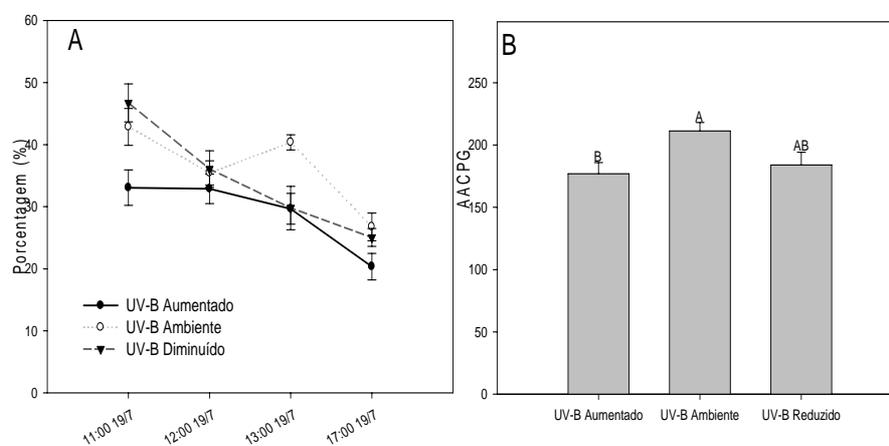


Gráfico 20 Germinação de *Clonostachys rosea*; A) durante o decorrer do ensaio; B) Área abaixo da curva de progresso da germinação (AACPG)
Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente pelo Teste Tukey (5%), barra de erro são desvio padrão de nove repetições

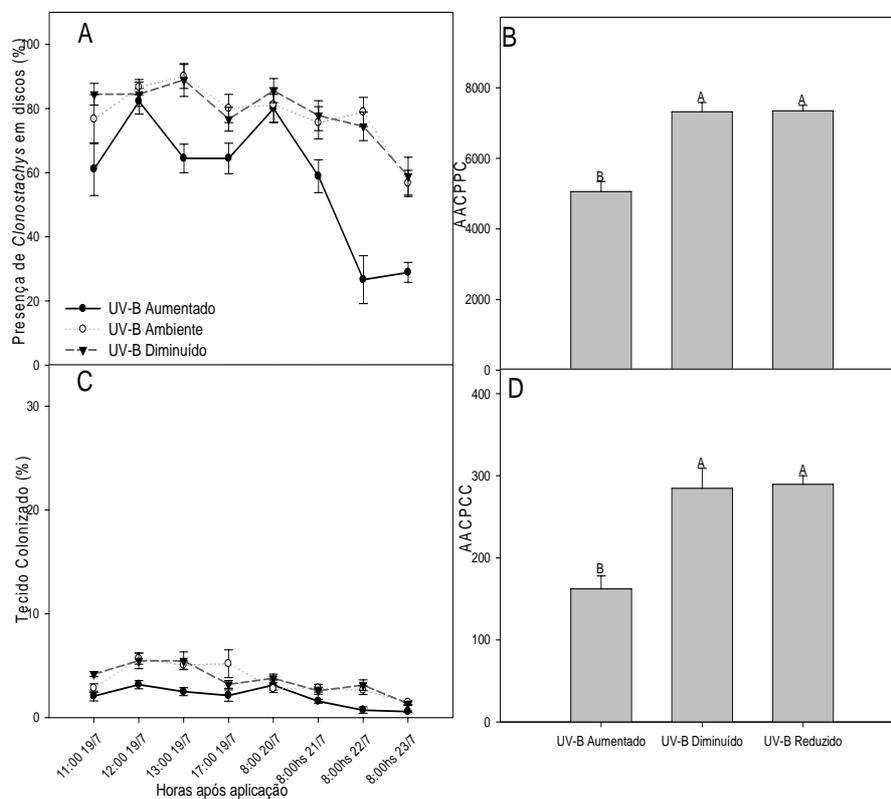


Gráfico 21 Teste de colonização; A) Presença de *Clonostachys rosea* (%) ao longo do ensaio; B) Área abaixo da curva de progresso da presença de *Clonostachys rosea* (AACPPC); C) Porcentagem de crescimento médio de *Clonostachys roseas* sobre os discos ao longo do ensaio; D) Área abaixo da curva de progresso do crescimento de *Clonostachys rosea* (AACPCC)

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente pelo Teste Tukey (5%), barra de erro são desvio padrão de nove repetições

4.11 Comparação entre os ensaios de sobrevivência (item 4.9) e estabelecimento (item 4.10) de *C. rosea*

Comparando os dois ensaios observa-se que aplicações do agente de controle biológico, durante o final do dia, resultaram em maior área abaixo da curva do progresso da presença de *C. rosea* (AACPPC) nas folhas e a área abaixo da curva do progresso de colonização do *C. rosea* (AACPCC) (Gráfico 22 A, B). A germinação, também, foi maior quando a aplicação do agente de biocontrole ocorreu no final da tarde (Gráfico 18 e Gráfico 20 A, B).

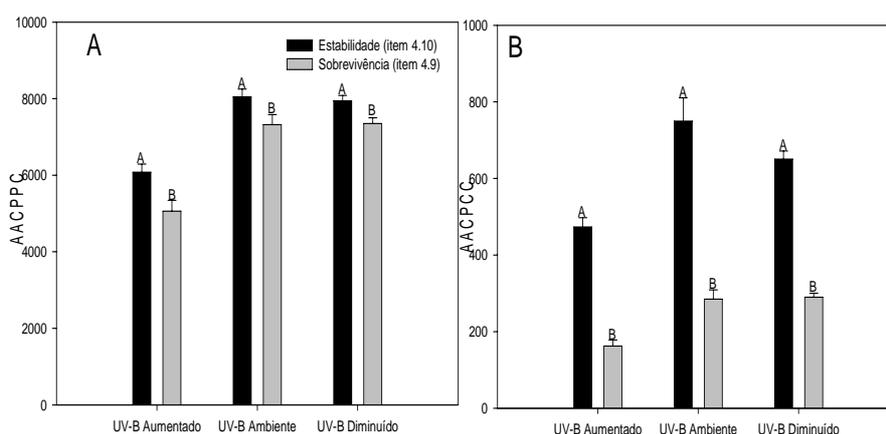


Gráfico 22 Teste de colonização; A) Área abaixo da curva de progresso da presença de *Clonostachys rosea* (AACPPC); B) Área abaixo da curva de progresso do crescimento de *Clonostachys rosea* (AACPCC)

Barras negras ensaio da estabilidade (item 4.10) Barras cinzas ensaio da sobrevivência (item 4.9)

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente pelo Teste Tukey (5%), barra de erro são desvio padrão de nove repetições

5 DISCUSSÃO

Os efeitos do aumento da radiação UV-B têm sido estudados em diversos sistemas biológicos, como bactérias (FLORES et al., 2009; PEAK; PEAK, 1983), fungos filamentosos (BRAGA et al., 2001b; DUGUAY; KLIRONOMOS, 2000), plantas (BARNES; FLINT; RYEL, 2009; CALDWELL et al., 1995) e animais (CORSINI; SANGHA; FELDMAN, 1997; FAHLMAN; KROL, 2009), obtendo-se variação de respostas.

Durante todos os ensaios com radiação UV-B, houve evidente redução da germinação relativa e, em alguns casos, a total inativação dos conídios de *Trichoderma* spp e *C. rosea* após poucas horas de exposição à radiação UV-B (Gráfico 5), sendo essas doses verificadas no ambiente. Outra importante consequência está na redução da velocidade de germinação dos conídios. Este fato foi reportado por diversos autores, trabalhando com *Metarhizium* (ZIMMERMANN, 1982), *Trichoderma* (BRAGA et al., 2002) e no presente estudo com *C. rosea* (Gráfico 2). Isto mostra que o conídio, quando irradiado, necessita de um tempo para se recuperar dos efeitos da radiação UV-B antes de retornar ao processo de germinação (BRAGA et al., 2001b). A redução da germinação deve ser atribuída a diferentes níveis de tolerância à radiação que são capazes de interromper o ciclo celular, resultando em dano ao material genético e outras estruturas celulares (PETROCELLI; SLINGERLAND, 2000).

Segundo Braga et al. (2006), não houve diferença na germinação dos conídios de isolados de *Metarhizium* sp. irradiados com radiação UV-B na avaliação de 24 h para 36 h após a exposição. Esse fato mostra que os conídios não germinados estavam inviáveis, mesmo após maior tempo de incubação. Dados semelhantes foram obtidos no presente trabalho (Gráfico 3), pois, a germinação após 36 h foi praticamente semelhante à 24 h. Nesse caso, os poucos

conídios germinados permitem um intenso crescimento do fungo o que dificulta novas avaliações.

A coloração dos conídios está envolvida na tolerância à radiação UV-B (BRAGA et al., 2006; KAWAMURA; TSUJIMOTO; TSUGE, 1999; WANG; CASADEVALL, 1994). Para *Metarhizium*, a síntese do pigmento verde do isolado selvagem apresenta maior resistência do conídio às condições de estresse do que conídios com pigmentação branca. Assim, verifica-se que a cor dos conídios é influenciada por dois fatores (MAGOON; MESSING-AL-AIDROOS, 1986): o genético do isolado e, principalmente, as condições ambientes do meio de cultura que afetam a fisiologia, morfologia e a coloração dos conídios de *M. anisopliae* (RANGEL et al., 2005). Com *Metarhizium*, trabalhos envolvendo pigmentação são fáceis de serem produzidos em laboratório pelo fato do fungo sofrer facilmente mutação a doses baixas de radiação UV-B. Entretanto, na natureza isolados albinos não são comumente observados, apesar do sol prover doses similares de radiação, mostrando que cor de conídio é um fator adaptativo ao ambiente (BRAGA et al., 2006).

Pigmentos, como melanina e carotenoides, também, estão sendo identificados e estudados em outras espécies de fungos como compostos capazes de aumentar a resistência dos conídios a situações de estresse como: oxidantes, calor e antimicrobianos, além de ser associado com a patogenicidade de alguns fungos (JACOBSON, 2000). A importância evolutiva do pigmento melanina é o fato do mesmo ser produzido por organismos de todos os grupos taxonômicos, desde procariontes até vertebrados superiores (PLONKA; GRABACKA, 2006). Melanina é alocada fora da membrana plasmática, sendo um importante componente estrutural da parede celular do conídio e da hifa (BRAGA et al., 2006). Segundo Klein e Everleigh (1998), espécies de *Trichoderma* apresentam maior quantidade de pigmentos e de melanina em seus conídios que isolados de *Gliocladium roseum* (sin. *C. rosea*). Por isso, foi evidente uma maior resistência

dos conídios de *Trichoderma* em todos os ensaios realizados em meio de cultura artificial (Gráfico 2, 3, 4 e 5).

Para o teste de seleção de isolados tolerantes à radiação UV-B foi verificado que a dose de $4,2 \text{ kJ m}^{-2}$ foi suficiente para determinar o isolado mais tolerante de *C. rosea* (Gráfico 4 A). Doses baixas de radiação UV-B, também, foram capazes de determinar a tolerância de *Beauveria* (FARGUES et al., 1996). Isolados de *Beauveria* spp. são diferenciados em relação a tolerância à radiação UV-B, apresentando germinação relativa entre 0 a 100 % dependendo apenas do isolado (FERNANDES et al., 2007). Para *Trichoderma*, o mesmo teste não foi capaz de classificar os isolados pela sua tolerância à radiação UV-B, pois, estes apresentaram resultados muito próximos (Gráfico 4 B). Para esse estudo seria necessário aumentar a dose de radiação UV-B.

Por causa do reduzido número de isolados nos ensaios e a baixa variabilidade de regiões dos isolamentos (Tabela 1) ficou improvável apontar que a diferença de resistência tenha sido ocasionada por diferenças na latitude e longitude do ponto de origem destes organismos como observados por (BRAGA et al., 2001c) para *Metarhizium*. Segundo Braga et al. (2001d), organismos provenientes de regiões de altitudes elevadas e próximas à linha do Equador tendem a apresentar maior tolerância à radiação ultravioleta. Entretanto, essa mesma correlação não foi observada para isolados de *Beauveria* spp. (FERNANDES et al., 2007).

No teste de UV-B sob diferentes tempos de germinação do conídio (Gráfico 6), podem ser explicados em virtude das mudanças morfofisiológicas dos conídios, durante sua germinação, porque diferentes metabólicos são encontrados na célula do conídio, conforme seu estágio de desenvolvimento, deixando-o mais sensível à radiação UV-B. Para *Metarhizium* a fase mais sensível do conídio à radiação UV-B foi durante o final da germinação (BRAGA et al., 2001c). A relação entre desenvolvimento do conídio mediante seus

metabolitos e fotossensibilidade à radiação UV-B foram demonstrados, também, por Perennes et al. (1999). Segundo Schmit e Brody (1976), foi demonstrado para diversas espécies de fungos que a duplicação do DNA ocorre durante o final da fase de germinação tornando essa fase do conídio mais sensível a estresse de origem ambiental. Os resultados do ensaio 4.5 concordam com os acima relatados onde os conídios se mostraram mais sensíveis no final da fase de germinação (Gráfico 6). Houve maior velocidade de germinação dos conídios de *C. rosea* do que de *Trichoderma* (Gráfico 3) explicando porque o conídio de *C. rosea* necessitou menor tempo de incubação.

Os ensaios envolvendo tecidos do hospedeiro mostraram que os conídios têm aumentado seu poder de germinação com as mesmas doses de radiação UV-B (Gráfico 5 e 7). Foi possível observar que, nas menores concentrações de conídios, os mesmos sofreram maior influência de doses de radiação UV-B (Gráfico 10), além de proporcionar uma menor capacidade antagônica ao patógeno (Gráfico 13).

A capacidade de competição de *C. rosea* com *B. cinerea* é o principal mecanismo de ação do agente de controle biológico (MORANDI et al., 2003), sendo a capacidade em colonizar o hospedeiro como endofítico e a capacidade de colonizar tecido senescente sendo os principais meios de competição (MORANDI et al., 2000). Assim, a radiação UV-B pode diminuir a capacidade de competição em decorrência de uma menor viabilidade dos conídios e um menor crescimento de *C. rosea* favorecendo o patógeno. Outro fator favorável ao patógeno é que sua esporulação está fortemente ligada a fatores ambientais e entre eles a radiação ultravioleta. A utilização de filmes de polietileno em casa de vegetação que retém a radiação no comprimento de onda 300 a 400 nm reduziu a produção de conídios de *B. cinerea* em 10 vezes, mostrando que o aumento do UV-B não será tão prejudicial ao patógeno quanto é para o agente

de biocontrole. Com isso, o aumento da radiação UV-B ambiental, gerado a partir das mudanças climáticas, pode favorecer o patógeno (NICOT et al., 1996).

Com os ensaios de sobrevivência (Gráfico 19) e estabilidade (Gráfico 21) ficou mais uma vez evidente que condições de microclima são fundamentais para o sucesso das aplicações de *C. rosea* (Gráfico 22) concordando com os resultados de Morandi et al. (2006) e Sutton et al. (1997). O UV-B aumentado proporcionou uma redução geral na presença e no crescimento de *C. rosea* (Gráfico 19 e Gráfico 21) sugerindo que as alterações climáticas seriam prejudiciais ao agente de biocontrole. A utilização de filtros de poliéster que exclui entre 70 a 80% da radiação ultravioleta não proporcionou um aumento na presença e no crescimento de *C. rosea* (Gráfico 19 A, B, C, D e 21 A, B, C, D). Esse fato pode ter ocorrido, em função do filtro ter aumentado a temperatura no interior da parcela (dados não apresentados) já que é verificado que condições ideais para *C. rosea* são alta umidade e temperaturas em torno de 15 a 25 °C (SUTTON et al., 1997). Um maior aumento da longevidade de conídios de *B. bassiana* foi conseguido com a utilização de filtros que retiveram a radiação UV-B em casa de vegetação (COSTA; ROBB; WILEN, 2001).

Para um agente de controle biológico, características como alta virulência e boa habilidade em sobreviver fora do hospedeiro são necessários, pois, durante aplicações a campo, condições ambientais extremas são encontradas. Esse aspecto difere das encontradas pelo fungo na natureza, como por exemplo, aplicações de *Metarhizium* serem geralmente foliares e o fungo é um organismo de solo (BRAGA et al., 2001c). Por isso, a habilidade do fungo em dispersar no habitat do hospedeiro é importante para o sucesso do controle biológico (BIDOCHKA et al., 2001).

A radiação ultravioleta induz a formação de dímeros de pirimidina no DNA causando mutação e erro na transcrição (GRIFFITHS et al., 1998). Além desse efeito direto, é necessário imaginar que agentes de controle biológico de

doenças de plantas estão expostos simultaneamente a efeitos indiretos como calor e a dessecação (FARGUES et al., 1997; RANGEL et al., 2005). Assim, trabalhos envolvendo ensaios de campo e a viabilidade dos conídios são reduzidos. Com isso, estudos envolvendo a seleção de isolados para programas de controle biológico deveriam levar em consideração, além da virulência e germinação a baixas condições de umidade relativa, a tolerância do agente de biocontrole à radiação UV-B (FARGUES et al., 1996) e, também, estudos com formulações que protejam os conídios de condições ambientais adversas devem ser necessários (DAOUST; ROBERTS, 1983; INYANG et al., 2000; JACKSON; ERHAN, 2006), sendo importantes para a prática com produtos biológicos.

6 CONCLUSÕES

A radiação UV-B apresentou forte ação deletéria na germinação dos conídios de *Clonostachys rosea* e *Trichoderma*.

As diferentes fases do processo de germinação dos conídios de *C. rosea* e de *Trichoderma* apresentam sensibilidade diferenciada à radiação UV-B.

Todos os isolados de *Trichoderma* apresentaram maior resistência à radiação UV-B do que os de *C. rosea*.

Os isolados LQC 62 (*C. rosea*) e LQC 88, 99 e 96 (*Trichoderma* spp.) foram os mais tolerantes à radiação UV-B.

Em discos de folha, *C. rosea* apresentou maior tolerância à radiação UV-B quando comparado ao teste de germinação em meio de cultura artificial. Concentrações menores de conídios apresentaram uma presença e crescimento menor de *C. rosea* além de apresentar, também, uma menor capacidade antagônica a *Botrytis cinerea*.

Em condições de campo, a radiação UV-B reduziu a presença e o crescimento de *C. rosea* sobre os discos.

REFERÊNCIAS

- AINSWORTH, E. A. et al. A meta-analysis of elevated [CO₂] effects on soybean (*Glycine max*) physiology, growth and yield. **Global Change Biology**, Oxford, v. 8, n. 8, p. 695-709, Aug. 2002.
- ALVARADO-GUTIERREZ, A. et al. A *Phaseolus vulgaris* EF-hand calcium-binding domain is induced early in the defense response against *Colletotrichum lindemuthianum* and by abiotic stress: sequences shared between interacting partners. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 72, n. 4/6, p. 111-121, July/Sept. 2008.
- ANTOGNONI, F. et al. Induction of flavonoid production by UV-B radiation in *Passiflora quadrangularis callus* cultures. **Fitoterapia**, Milano, v. 78, n. 5, p. 345-352, 2007.
- BAKER, R. Improved *Trichoderma* spp. for promoting crop productivity. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 7, n. 2, p. 34-38, Feb. 1989.
- BALLARE, C. L. Stress under the sun: spotlight on ultraviolet-B responses. **Plant Physiology**, Washington, v. 132, n. 4, p. 1725-1727, Aug. 2003.
- 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.
- BARNES, P. W.; FLINT, S. D.; RYEL, R. J. Diurnal changes in UV-shielding in plants. **Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular & Integrative Physiology**, Oxford, v. 153A, n. 2, p. S201-S202, June 2009.
- BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle biológico. In: KIMATI, H. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Ceres, 1995. v. 1, p. 898-910.
- BIDOCHKA, M. J. et al. Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: uncovering cryptic species? **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 3, p. 1335-1342, Mar. 2001.
- BISCHOF, K. et al. Ultraviolet radiation shapes seaweed communities. **Review Environment and Science Biotechnology**, London, v. 5, n. 2, p. 187-212, Aug. 2007.

BLANCO, C.; 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**, Dordrecht, v. 114, n. 4, p. 415-425, Apr. 2006.

BOFF, P. et al. Biological control of gray mold with *Ulocladium atrum* in annual strawberry crops. **Plant Disease**, Quebec, v. 86, n. 3, p. 220-224, Mar. 2002.

BOXALL, A. B. A. et al. Impacts of climate change on indirect human exposure to pathogens and chemicals from agriculture. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 117, n. 4, p. 508-514, Dec. 2009.

BRAGA, G. U. L. et al. Both solar UVA and UVB radiation impair conidial culturability and delay germination in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Photochemistry and Photobiology**, Lausanne, v. 74, n. 5, p. 734-739, Nov. 2001a.

_____. Conidial pigmentation is important to tolerance against solar-simulated radiation in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Photochemistry and Photobiology**, Lausanne, v. 82, n. 2, p. 418-422, Mar. 2006.

_____. Damage and recovery from UV-B exposure in conidia of the entomopathogens *Verticillium lecanii* and *Aphanocladium album*. **Mycologia**, New York, v. 94, n. 6, p. 912-920, May 2002.

BRAGA, G. U. L. et al. Effect of UV-B on conidia and germlings of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, n. 4, p. 874-882, July 2001b.

_____. Effects of UVB irradiance on conidia and germinants of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*: a study of reciprocity and recovery. **Photochemistry and Photobiology**, Lausanne, v. 73, n. 2, p. 140-146, Feb. 2001c.

_____. 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**, Riverside, v. 78, n. 2, p. 98-108, Aug. 2001d.

CABRERA, S.; BOZZO, S.; FUENZALIDA, H. Variations in UV-radiation in Chile. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, Lausanne, v. 28, n. 2, p. 137-142, May 1995.

CALDWELL, M. M. et al. Effects of increased solar ultraviolet radiation on terrestrial ecosystems. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, Lausanne, v. 46, n. 1/3, p. 40-52, May 1998.

_____. Effects of increased solar ultraviolet-radiation on terrestrial plants. **Ambio**, Stockholm, v. 24, n. 3, p. 166-173, Oct. 1995.

CALDWELL, M. M.; FLINT, S. D. Stratospheric ozone reduction, solar UV-B radiation and terrestrial ecosystems. **Climatic Change**, Dordrecht, v. 28, n. 4, p. 375-394, Jan. 1994.

CARD, S. D. et al. Targeted selection of antagonistic microorganisms for control of *Botrytis cinerea* of strawberry in New Zealand. **Australasian Plant Pathology**, Melbourne, v. 38, n. 2, p. 183-192, Feb. 2009.

CASSIOLATO, A. M. R.; BAKER, R.; MELO, I. S. Promoção de crescimento de plantas de alface por *Trichoderma harzianum*. **Revista de Agricultura**, Recife, v. 71, n. 1, p. 55-65, jul. 1998.

COAKLEY, S. M.; SCHERM, H.; CHAKRABORTY, S. Climate change and plant disease management. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, p. 399-426, Sept. 1999.

COOK, R. J. B.; BAKER, K. F. (Ed.). **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. Saint Paul: APSed, 1983. 254 p.

CORSINI, E.; SANGHA, N.; FELDMAN, S. R. Epidermal stratification reduces the effects of UVB (but not UVA) on keratinocyte cytokine production and cytotoxicity. **Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine**, London, v. 13, n. 4, p. 147-152, Aug. 1997.

COSTA, H. S.; ROBB, K. L.; WILEN, C. A. Increased persistence of *Beauveria bassiana* spore viability under high ultraviolet-blocking greenhouse plastic. **Hortscience**, Alexandria, v. 36, n. 6, p. 1082-1084, July 2001.

COTA, L. V. et al. Biological control of strawberry gray mold by *Clonostachys rosea* under field conditions. **Biological Control**, Orlando, v. 46, n. 3, p. 515-522, Sept. 2008a.

_____. _____. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 98, n. 6, p. S41-S42, Sept. 2008b. Supplement.

DAOUST, R. A.; ROBERTS, D. W. Studies on the prolonged storage of metarhizium-anisopliae conidia: effect of temperature and relative-humidity on conidial viability and virulence against mosquitos. **Journal of Invertebrate Pathology**, Riverside, v. 41, n. 2, p. 143-150, 1983.

DONG, J. Y. et al. Nematicidal effect of freshwater fungal cultures against the pine-wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v. 15, n. 1, p. 125-135, Jan. 2004.

DUGUAY, K. J.; KLIRONOMOS, J. N. Direct and indirect effects of enhanced UV-B radiation on the decomposing and competitive abilities of saprobic fungi. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 14, n. 4, p. 157-164, Apr. 2000.

ELAD, Y. et al. Use of *Trichoderma-harzianum* in combination or alternation with fungicides to control cucumber gray mold (*Botrytis-cinerea*) under commercial greenhouse conditions. **Plant Pathology**, Washington, v. 42, n. 3, p. 324-332, Apr. 1993.

ENSMINGER, P. A. Control of development in plants and fungi by far-UV radiation. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 88, n. 3, p. 501-508, Apr. 1993.

FAHLMAN, B. M.; KROL, E. S. UVA and UVB radiation-induced oxidation products of quercetin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, Lausanne, v. 97, n. 3, p. 123-131, Dec. 2009.

FARGUES, J. M. et al. Inactivation of conidia of *Paecilomyces fumosoroseus* by near-ultraviolet (UVB and UVA) and visible radiation. **Journal of Invertebrate Pathology**, Riverside, v. 69, n. 1, p. 70-78, Jan. 1997.

_____. Variability in susceptibility to simulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic Hyphomycetes. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 135, n. 3, p. 171-181, Sept. 1996.

FARIA, A. Y. K.; ALBUQUERQUE, M. C.; CASSETARI NETO, D. C. Qualidade fisiológica de sementes de algodoeiro submetidas a tratamentos químico e biológico. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 25, n. 1, p. 121-127, jul. 2003.

FERNANDES, E. K. K. et al. Variability in tolerance to UV-B radiation among *Beauveria* spp. isolates. **Journal of Invertebrate Pathology**, Riverside, v. 96, n. 6, p. 237-243, Nov. 2007.

FLORES, M. R. et al. Isolation of UV-B resistant bacteria from two high altitude Andean lakes (4,400 m) with saline and non saline conditions. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 55, n. 6, p. 447-458, Dec. 2009.

FREEMAN, S. et al. *Trichoderma* biocontrol of *Colletotrichum acutatum* and *Botrytis cinerea* and survival in strawberry. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 110, n. 4, p. 361-370, Nov. 2004.

GERM, M. et al. Flavonoid, tannin and hypericin concentrations in the leaves of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) are affected by UV-B radiation levels. **Food Chemistry**, London, v. 122, n. 3, p. 471-474, Oct. 2010.

GHINI, R.; HAMADA, E.; BETTIOL, W. Climate change and plant diseases. **Scientia Agricola**, Piracicaba, n. 65, p. 98-107, 2008.

GODIN-BEEKMANN, S. Spatial observation of the ozone layer. **Comptes Rendus Geoscience**, Paris, v. 342, n. 4/5, p. 339-348, 2010.

GRIFFITHS, H. R. et al. Molecular and cellular effects of ultraviolet light-induced genotoxicity. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, Boca Raton, v. 35, n. 3, p. 189-237, June 1998.

GUETSKY, R. et al. Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 91, n. 7, p. 621-627, July 2001.

GULLINO, M. L.; ALOI, C.; GARIBALDI, A. Influence of spray schedules on fungicide resistant populations of *Botrytis-cinerea* pers on grapevine. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, Netherlands, v. 95, n. 4, p. 87-94, Dec. 1989.

HADER, D. P. et al. Aquatic ecosystems: effects of solar ultraviolet radiation and interactions with other climatic change factors. **Photochemical & Photobiological Sciences**, London, v. 2, n. 1, p. 39-50, Jan. 2003.

HAMMER, P. E.; EVENSEN, K. B.; JANISIEWICZ, W. J. Postharvest control of *Botrytis cinerea* on cut rose flowers with pyrrolnitrin. **Plant Disease**, Quebec, v. 77, n. 3, p. 283-286, July 1993.

HANNUKKALA, A. O. et al. Late-blight epidemics on potato in Finland, 1933-2002: increased and earlier occurrence of epidemics associated with climate change and lack of rotation. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 56, n. 1, p. 167-176, Feb. 2007.

HOLLANDSWORTH, S. M. et al. Ozone trends deduced from combined nimbus-7 sbuv and noaa-11 sbuv/2 data. **Geophysical Research Letters**, Washington, v. 22, n. 8, p. 905-908, June 1995.

HOLZINGER, A.; LUTZ, C. Algae and UV irradiation: effects on ultrastructure and related metabolic functions. **Micron**, New York, v. 37, n. 3, p. 190-207, Apr. 2006.

HONDA, Y.; YUNOKI, T. Control of *Sclerotinia* disease of greenhouse eggplant and cucumber by inhibition of development of apothecia. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 61, n. 12, p. 1036-1040, Dec. 1977.

HOWELL, C. R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, Quebec, v. 87, n. 1, p. 4-10, Jan. 2003.

HOWELL, C. R. et al. Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 90, n. 3, p. 248-252, Mar. 2000.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. **Climate change 2007: synthesis report: contribution of working groups I, II and III to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change**. Geneva, 2007. 104 p.

INYANG, E. N. et al. Effect of formulation, application and rain on the persistence of the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* on oilseed rape. **Mycological Research**, Cambridge, v. 104, n. 1, p. 653-661, June 2000.

JAAKOLA, L.; HOHTOLA, A. Effect of latitude on flavonoid biosynthesis in plants. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 33, n. 8, p. 1239-1247, Apr. 2010.

JACKSON, M. A.; ERHAN, S. Influence of formulation additives on the desiccation tolerance and storage stability of blastospores of the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 16, n. 1, p. 61-75, Feb. 2006.

JACOBSON, E. S. Pathogenic roles for fungal melanins. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 13, n. 4, p. 708-717, Oct. 2000.

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

JOHNSON, D. Response of terrestrial microorganisms to ultraviolet-B radiation in ecosystems. **Research in Microbiology**, Paris, v. 154, n. 5, p. 315-320, June 2003.

KAWAMURA, C.; TSUJIMOTO, T.; TSUGE, T. Targeted disruption of a melanin biosynthesis gene affects conidial development and UV tolerance in the Japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 12, n. 1, p. 59-63, Jan. 1999.

KLEIN, D.; EVERLEIGH, D. E. Ecology of *Trichoderma*. In: KUBICEK, C. P.; HARMAN, G. E. (Ed.). **Trichoderma & Gliocladium: enzymes, biological control and commercial applications**. London: Taylor & Francis, 1998. v. 1, p. 57-74.

KOTI, S. et al. Interactive effects of carbon dioxide, temperature, and ultraviolet-B radiation on soybean (*Glycine max* L.) flower and pollen morphology, pollen production, germination, and tube lengths. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 412, p. 725-736, Feb. 2005.

KULUNCSICS, Z. et al. Wavelength dependence of ultraviolet-induced DNA damage distribution: involvement of direct or indirect mechanisms and possible artefacts. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, Lausanne, v. 49, n. 1, p. 71-80, Mar. 1999.

KUNZ, B. A. et al. Plant responses to UV radiation and links to pathogen resistance. **International Review of Cytology, a Survey of Cell Biology**, New York, v. 255, n. 1, p. 1-40, Jan. 2006.

_____. UV-induced DNA damage promotes resistance to the biotrophic pathogen *Hyaloperonospora parasitica* in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Washington, v. 148, n. 2, p. 1021-1031, July 2008.

LAHOZ, E.; CONTILLO, R.; PORRONE, F. Induction of systemic resistance to *Erysiphe orontii* cast in tobacco by application on roots of an isolate of *Gliocladium roseum* bainier. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 152, n. 8/9, p. 465-470, Sept. 2004.

LEACH, C. M.; TRIONE, E. J. An action spectrum for light-induced sporulation of *Ascochyta pisi*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 56, n. 2, p. 149-150, Sept. 1966.

LEUN, J. C. The ozone layer. **Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine**, London, v. 20, n. 4, p. 159-162, Aug. 2004.

LI, J.; FENG, M. G. Intraspecific tolerance of *Metarhizium anisopliae* conidia to the upper thermal limits of summer with a description of a quantitative assay system. **Mycological Research**, Cambridge, v. 113, n. 6, p. 93-99, June 2009.

LÓPEZ-HERRERA, C. J. et al. Eradication of primary inoculum of *Botrytis cinerea* by soil solarization. **Plant Disease**, Quebec, v. 78, n. 6, p. 594-597, Feb. 1994.

MADRONICH, S.; DEGRUIJL, F. R. Skin-cancer and UV-radiation. **Nature**, London, v. 366, n. 6450, p. 23-25, Nov. 1993.

MADRONICH, S. et al. Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the earth's surface. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, Lausanne, v. 46, n. 1/3, p. 5-19, Jan. 1998.

MAGOON, J.; MESSING-AL-AIDROOS, K. Epistatic relationships and linkage among color markers of the imperfect entomopathogenic fungus *Metarhizium-anisopliae*. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, Ottawa, v. 28, n. 1, p. 96-100, Jan. 1986.

MCELTRONE, A. J. et al. Combined effects of elevated CO₂ and natural climatic variation on leaf spot diseases of redbud and sweetgum trees. **Environmental Pollution**, Barking, v. 158, n. 1, p. 108-114, Jan. 2010.

MCKENZIE, R. L. et al. Changes in biologically-active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. **Photochemical & Photobiological Sciences**, London, v. 6, n. 3, p. 218-231, Jan. 2007.

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**, Quebec, v. 86, n. 9, p. 1019-1024, Sept. 2002.

METCALF, D. A.; WILSON, C. R. The process of antagonism of *Sclerotium cepivorum* in white rot affected onion roots by *Trichoderma koningii*. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 50, n. 1, p. 249-257, Dec. 2001.

MILNER, R. J.; HUPPATZ, R. J.; SWARIS, S. C. A new method for assessment of germination of *Metarhizium* conidia. **Journal of Invertebrate Pathology**, Riverside, v. 57, n. 1, p. 121-123, Jan. 1991.

MOHAMMED, A. R.; TARPLEY, L. Differential response of southern US rice (*Oryza sativa* L.) cultivars to ultraviolet-B radiation. **Journal of Agronomy and Crop Science**, Hoboken, v. 196, n. 4, p. 286-295, Feb. 2010.

MOORE, D. et al. Ultraviolet radiation-damage to *Metarhizium-flavoviride* conidia and the protection given by vegetable and mineral-oils and chemical sunscreens. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 122, n. 3, p. 605-616, Feb. 1993.

MORANDI, M. A. B. et al. Effects of host and microbial factors on development of *Clonostachys rosea* and control of *Botrytis cinerea* in rose. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 106, n. 5, p. 439-448, Feb. 2000.

_____. Relationships of microclimatic variables to colonization of rose debris by *Botrytis cinerea* and the biocontrol agent *Clonostachys rosea*. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 16, n. 6, p. 619-630, June 2006.

_____. 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.; BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: _____. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2009. p. 7-14.

MUELLER, J. D.; SINCLAIR, J. B. Occurrence and role of *Gliocladium-roseum* in field-grown soybeans in illinois. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 86, n. 2, p. 677-680, June 1986.

NICOT, P. C. et al. Differential spore production by *Botrytis cinerea* on agar medium and plant tissue under near-ultraviolet light-absorbing polyethylene film. **Plant Disease**, Quebec, v. 80, n. 5, p. 555-558, May 1996.

NORTHOVER, J.; MATTEONI, J. A. Resistance of *Botrytis-cinerea* to benomyl and iprodione in vineyards and greenhouses after exposure to the fungicides alone or mixed with Captan. **Plant Disease**, Quebec, v. 70, n. 5, p. 398-402, Oct. 1986.

PAUL, N. D. Stratospheric ozone depletion, UV-B radiation and crop disease. **Environmental Pollution**, Barking, v. 108, n. 3, p. 343-355, June 2000.

PAUL, N. D.; GWYNN-JONES, D. Ecological roles of solar UV radiation: towards an integrated approach. **Trends in Ecology & Evolution**, Amsterdam, v. 18, n. 1, p. 48-55, Jan. 2003.

PEAK, M. J.; PEAK, J. G. Use of action spectra for identifying molecular targets and mechanisms of action of solar ultraviolet-light. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 58, n. 3, p. 367-372, July 1983.

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

PERCY, K. E. et al. Altered performance of forest pests under atmospheres enriched by CO₂ and O₃. **Nature**, London, v. 421, n. 6919, p. 190-191, Nov. 2003.

PERENNES, C. et al. Is arcA3 a possible mediator in the signal transduction pathway during agonist cell cycle arrest by salicylic acid and UV irradiation? **Journal of Cell Science**, London, v. 112, n. 8, p. 1181-1190, Mar. 1999.

PETROCELLI, T.; SLINGERLAND, J. UVB induced cell cycle checkpoints in an early stage human melanoma line, WM35. **Oncogene**, Basingstoke, v. 19, n. 39, p. 4480-4490, Sept. 2000.

PHOENIX, G. K. et al. Effects of global change on a sub-Arctic heath: effects of enhanced UV-B radiation and increased summer precipitation. **Journal of Ecology**, Durham, v. 89, n. 2, p. 256-267, Apr. 2001.

PIAZENA, H. The effect of altitude upon the solar UV-B and UV-A irradiance in the tropical Chilean Andes. **Solar Energy**, Kidlington, v. 57, n. 2, p. 133-140, Aug. 1996.

PLONKA, P. M.; GRABACKA, M. Melanin synthesis in microorganisms: biotechnological and medical aspects. **Acta Biochimica Polonica**, Warszawa, v. 53, n. 3, p. 429-443, Sept. 2006.

POWELSON, R. L. Initiation of strawberry fruit rot caused by *Botrytis-cinerea*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 50, n. 7, p. 491-494, Jan. 1960.

QUAITE, F. E.; SUTHERLAND, B. M.; SUTHERLAND, J. C. Action spectrum for DNA damage in alfalfa lowers predicted impact of ozone depletion. **Nature**, London, v. 358, n. 6387, p. 576-578, Aug. 1992.

RABOLLE, M. et al. Determination of fungicide residues in field-grown strawberries following different fungicide strategies against gray mold (*Botrytis cinerea*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 3, p. 900-908, Feb. 2006.

RANGEL, D. E. N. et al. Influence of growth environment on tolerance to UV-B radiation, germination speed, and morphology of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* conidia. **Journal of Invertebrate Pathology**, Riverside, v. 90, n. 1, p. 55-58, Sept. 2005.

_____. Variations in UV-B tolerance and germination speed of *Metarhizium anisopliae* conidia produced on insects and artificial substrates. **Journal of Invertebrate Pathology**, Riverside, v. 87, n. 2/3, p. 77-83, Oct./Nov. 2004.

REDDY, N. P. et al. Assessment of the suitability of Tinopal as an enhancing adjuvant in formulations of the insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. **Pest Management Science**, Sussex, v. 64, n. 9, p. 909-915, Sept. 2008.

ROLEDA, M. Y. et al. Sensitivity of the early life stages of macroalgae from the northern hemisphere to ultraviolet radiation. **Photochemistry and Photobiology**, Lausanne, v. 83, n. 4, p. 851-862, July/Aug. 2007.

ROZEMA, J. et al. UV-B as an environmental factor in plant life: stress and regulation. **Trends in Ecology & Evolution**, Amsterdam, v. 12, n. 1, p. 22-28, Jan. 1997.

SAHA, D. C.; JACKSON, M. A.; JONHSON-CICALESE, J. M. A rapid staining method for detection of endophytic fungi in turf and forage grasses. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 78, n. 2, p. 237-239, Sept. 1988.

SCHADE, N.; ESSER, C.; KRUTMANN, J. Ultraviolet B radiation-induced immunosuppression: molecular mechanisms and cellular alterations. **Photochemical & Photobiological Sciences**, London, v. 4, n. 9, p. 699-708, Sept. 2005.

SCHMIT, J. C.; BRODY, S. Biochemical genetics of *Neurospora-crassa* conidial germination. **Bacteriological Reviews**, Baltimore, v. 40, n. 1, p. 1-41, Mar. 1976.

SCHROERS, H. J. A monograph of *Bionectria* (Ascomycota, Hypocreales, Bionectriaceae) and its *Clonostachys* anamorphs. **Studies in Mycology**, Berlin, v. 46, n. 1, p. 1-14, June 2001.

SCHROERS, H. J. et al. Classification of the mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys* as *C-rosea*, its relationship to *Bionectria ochroleuca*, and notes on other *Gliocladium*-like fungi. **Mycologia**, New York, v. 91, n. 2, p. 365-385, Oct. 1999.

SHEA, K. M. et al. Climate change and allergic disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, Saint Louis, v. 122, n. 3, p. 443-453, June 2008.

SHORESH, M.; YEDIDIA, I.; CHET, I. Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 95, n. 1, p. 76-84, Jan. 2005.

SOBRINO, C.; MONTERO, O.; LUBIÁN, L. M. UV-B radiation increases cell permeability and damages nitrogen incorporation mechanisms in *Nannochloropsis gaditana*. **Aquatic Sciences**, Basel, v. 66, n. 4, p. 421-429, Apr. 2004.

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**, Ottawa, v. 12, n. 1, p. 100-110, Nov. 1990.

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

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

SWADLING, I. R.; JEFFRIES, P. Isolation of microbial antagonists for biocontrol of grey mould disease of strawberries. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 6, n. 1, p. 125-136, Mar. 1996.

TANHUA, T. et al. Ventilation of the arctic ocean: mean ages and inventories of anthropogenic CO₂ and CFC-11. **Journal of Geophysical Research-Oceans**, Washington, v. 114, n. 1, p. 1-11, Jan. 2009.

TATAGIBA, J. D. S. et al. Biological control of *Botrytis cinerea* in residues and flowers of rose (*Rosa hybrida*). **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 26, n. 1, p. 8-19, Nov. 1998.

TEDETTI, M.; SEMPERE, R. Penetration of ultraviolet radiation in the marine environment: a review. **Photochemistry and Photobiology**, Lausanne, v. 82, n. 2, p. 389-397, Mar./Apr. 2006.

TIMUDO-TORREVILLA, O. E. et al. Present status of strawberry fruit rot diseases in New Zealand. **New Zealand Plant Protection Society**, Christchurch, v. 58, n. 1, p. 74-79, June 2005.

TOLEDO, A. V. et al. First record of *Clonostachys rosea* (Ascomycota: Hypocreales) as an entomopathogenic fungus of *Oncometopia tucumana* and *Sonesimia grossa* (Hemiptera : Cicadellidae) in Argentina. **Journal of Invertebrate Pathology**, Riverside, v. 92, n. 1, p. 7-10, May 2006.

TRONSMO, A.; DENNIS, C. Use of *Trichoderma* species to control strawberry fruit rots. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, Netherlands, v. 83, p. 449-455, July 1977.

TSAI, M. L. et al. UVB radiation induces persistent activation of ribosome and oxidative phosphorylation pathways. **Radiation Research**, New York, v. 171, n. 6, p. 716-724, June 2009.

TURUNEN, M.; LATOLA, K. UV-B radiation and acclimation in timberline plants. **Environmental Pollution**, Barking, v. 137, n. 3, p. 390-403, Oct. 2005.

VICCINI, G. et al. Exopolysaccharide from surface-liquid culture of *Clonostachys rosea* originates from autolysis of the biomass. **Archives of Microbiology**, New York, v. 191, n. 4, p. 369-378, Apr. 2009.

WANG, Y. L.; CASADEVALL, A. Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus-neoformans* to UV-light. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 10, p. 3864-3866, Oct. 1994.

WEINDLING, R. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 22, p. 837-845, Sept. 1932.

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

XUE, A. G. Biological control of pathogens causing root rot complex in field pea using *Clonostachys rosea* strain ACM941. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, n. 3, p. 329-335, Mar. 2003.

YU, H.; SUTTON, J. C. Morphological development and interactions of *Gliocladium roseum* and *Botrytis cinerea* in raspberry. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 19, n. 3, p. 237-246, Sept. 1997.

ZHANG, J.; HOWELL, C. R.; STARR, J. L. Suppression of *Fusarium* colonization of cotton roots and fusarium wilt by seed treatments with *Gliocladium virens* and *Bacillus subtilis*. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 6, n. 2, p. 175-187, Sept. 1996.

ZHAO, D. L. et al. Leaf and canopy photosynthetic characteristics of cotton (*Gossypium hirsutum*) under elevated CO₂ concentration and UV-B radiation. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 161, n. 5, p. 581-590, May 2004.

ZIMMERMANN, G. Effect of high-temperatures and artificial sunlight on the viability of conidia of *Metarhizium-anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, Riverside, v. 40, n. 1, p. 36-40, July 1982.