

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CÂMPUS DE BOTUCATU

**EFEITO DA RADIAÇÃO UV-B NA INTERAÇÃO**  
*Botrytis cinerea* – *Clonostachys rosea* **EM MORANGUEIRO E DO**  
**ÁCIDO 4-AMINOBENZÓICO NO CONTROLE DO PATÓGENO EM**  
**TABACO**

**LÚCIO BERTOLDO COSTA**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP – Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU - SP

Junho/2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CÂMPUS DE BOTUCATU

**EFEITO DA RADIAÇÃO UV-B NA INTERAÇÃO**  
*Botrytis cinerea* – *Clonostachys rosea* **EM MORANGUEIRO E DO**  
**ÁCIDO 4-AMINOBENZÓICO NO CONTROLE DO PATÓGENO EM**  
**TABACO**

**LÚCIO BERTOLDO COSTA**

Orientador: **Prof. Dr. Wagner Bettiol**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP – Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU - SP

Junho/2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO- BOTUCATU (SP)

C837e Costa, Lúcio Bertoldo, 1985-  
Efeito da radiação uv-b na interação *Botrytis cinerea* - *Clonostachys rosea* em morangueiro e do ácido 4-aminobenzóico no controle do patógeno em tabaco / Lúcio Bertoldo Costa. - Botucatu : [s.n.], 2014  
viii, 87 f. : ils., grafs., tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, 2014  
Orientador: Wagner Bettiol  
Inclui bibliografia

1. Morango. 2. Radiação ultravioleta. 3. *Botrytis Cinérea*. 4. Fungos - Controle. I. Bettiol, Wagner. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu. III. Título.

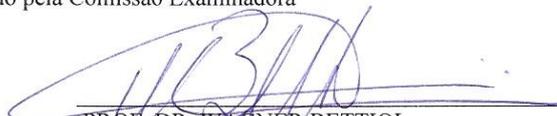
**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS**  
**CAMPUS DE BOTUCATU**  
**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO: EFEITO DA RADIAÇÃO UV-B NA INTERAÇÃO *Botrytis cinerea* -  
*Clonostachys rosea* EM MORANGUEIRO E DO ÁCIDO 4-AMINOBENZÓICO  
NO CONTROLE DO PATÓGENO EM TABACO

ALUNO: LÚCIO BERTOLDO COSTA

ORIENTADOR: PROF. DR. WAGNER BETTIOL

Aprovado pela Comissão Examinadora

  
\_\_\_\_\_  
PROF. DR. WAGNER BETTIOL

  
\_\_\_\_\_  
PROF. DR. EDSON LUIZ FURTADO

  
\_\_\_\_\_  
PROF. DR. ANTONIO CARLOS MARINGONI

  
\_\_\_\_\_  
PROF. DR. MARCELO AUGUSTO BOECHAT MORANDI

  
\_\_\_\_\_  
PROF. DR. GILBERTO UBIDA LEITE BRAGA

Data da Realização: 24 de junho de 2014

A luta e o trabalho são tão imprescindíveis ao aperfeiçoamento do Espírito, como o pão material é indispensável à manutenção do corpo físico. É trabalhando e lutando, sofrendo e aprendendo, que a alma adquire as experiências necessárias na sua marcha para a perfeição.

Emmanuel

Com todo o amor e gratidão dedico esse trabalho, especialmente, à minha mãe Sandra e ao meu avô Delvo Bertoldo, por todo o apoio, ensinamentos e carinho que foram decisivos à execução desse imenso projeto.

A vocês meu eterno obrigado!

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade do dom da vida e por todas as alegrias, provações e ensinamentos que me fazem crescer e amadurecer e que durante meu aprendizado vem me apresentando muitas pessoas iluminadas que tornaram a minha caminhada durante o doutorado mais feliz.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu (FCA), pela realização do Curso de doutorado.

À University of Guelph, pela oportunidade de realização de parte da tese nas suas instalações.

Ao CNPq, pela concessão da Bolsa de Estudos no Brasil.

À CAPES, pela concessão da Bolsa de Estudo no Canadá.

À Embrapa Meio Ambiente, por toda a infraestrutura oferecida e por ter sido determinante na execução do meu trabalho, além de ter me dado uma grande oportunidade de crescimentos profissional.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Proteção de Plantas) da FCA, por toda a paciência dedicação e conhecimento a mim transferidos durante o andamento do doutorado.

Ao meu orientador, Dr. Wagner Bettiol, pela orientação, confiança depositada, paciência, amizade, liberdade de pensamentos e diversas oportunidades oferecidas, essenciais para o meu crescimento profissional e pessoal.

Ao meu orientador canadense, Dr. Paul Goodwin, pela orientação e confiança, que fizeram do meu período vivido no Canadá essencial para o meu amadurecimento pessoal e profissional.

Aos amigos da FCA/Embrapa Cassiano, Carlos Eduardo, Dalton, Daniel, Guilherme, Carol, Zayame, Regiane, Michelle e Gabriel, aos amigos da UFLA André, Larissa e Fernando e aos amigos da University of Guelph Asifa, David, Amanda, Morammad, Weihong e Jee pela constante ajuda, boa vontade e amizade.

Aos pesquisadores da Embrapa Meio Ambiente, Marcelo AB Morandi, Rosa Frighetto, Kátia de Lima Nechet e Raquel Ghini, pelos ensinamentos e amizade que foram determinantes na execução do meu trabalho.

Aos amigos e funcionários do Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio

Ambiente, Rosely, Anamaria, Marcia e Elke, pela enorme boa vontade e ajuda na condução dos experimentos e na condução da vida.

À minha mãe, ao meu avô e irmãos, pelo suporte em todos os campos da minha vida, amor e compreensão e confiança.

A minha namorada Riziani, por toda a alegria, confiança motivação, apoio e paciência que foram fundamentais para execução do meu trabalho.

À minha família canadense Mr. Doug e Ms. Marry Tunner, por terem me adotado durante meu período no Canadá e por terem sido tão atenciosos e pacientes.

Obrigado a todos pela participação nesse trabalho, saibam que esse trabalho e fruto da contribuição de cada um de vocês!

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
LISTA DE FIGURAS .....	IX
LISTA DE TABELAS .....	XII
1. RESUMO .....	1
2. SUMMARY .....	3
3. INTRODUÇÃO.....	5
4. REVISÃO DE LITERATURA .....	8
4.1 O patógeno e a doença .....	8
4.2 <i>Clonostachys rosea</i> .....	10
4.3 Radiação ultravioleta-B.....	11
4.4 Ácido 4-aminobenzóico .....	13
<b>CAPÍTULO 1</b>	
UV-B radiation reduces biological control ability of <i>Clonostachys rosea</i> against <i>Botrytis cinerea</i> .....	16
Abstract .....	18
Introduction .....	18
Materials and Methods .....	19
Results .....	23
Discussion .....	25
References .....	26
<b>CAPÍTULO 2</b>	
Efeito da radiação ultravioleta-B no desenvolvimento de <i>Clonostachys rosea</i> em condições de campo e antagonismo a <i>Botrytis cinerea</i> .....	38
Resumo.....	40
Introdução .....	41
Material e Métodos .....	42
Resultados .....	46
Discussão .....	47
Referências Bibliográficas .....	49

## CAPÍTULO 3

Redução da doença causada por <i>Botrytis cinerea</i> com o uso de ácido para-aminobenzóico (PABA) .....	60
Resumo.....	62
Abstract .....	62
Introdução .....	63
Material e Métodos .....	64
Resultados .....	67
Discussão .....	67
Referências Bibliográficas .....	70
5. CONCLUSÕES .....	76
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	77

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

Figure 1. Spectral irradiances of the lamp setups used for the different UV treatments. Chamber providing UV-B irradiance of  $823 \text{ mW m}^{-2}$ , for the lamp heights of 18 centimeter from the sample second Quaita weighted. The chamber emitted dose of  $2.96 \text{ KJ m}^{-2}$  of UV-B radiation per hour. The lamps were covered with a 0.1-mm thick cellulose acetate, which blocked radiation below 290 nm. .... 29

Figure 2. Relative germination of *Botrytis cinerea* conidia after exposure to  $6.4 \text{ KJ m}^{-2}$  of UV-B radiation (Quaita weighted irradiance of  $823 \text{ mW m}^{-2}$  at a different weighted dose). Relative germination was calculated in relation to control plates. Graph bars with the same letters are not significantly different by the Tukey test at 5% of significance ( $p < 0.001$ ). Errors bar are standard deviation of three independent experiments. .... 30

Figure 3. Area Under Sporulation Curve of *Botrytis cinerea* strains in leaf disks. Graph bars with the same letters are not significantly different by the Tukey test at 5 % of significance ( $p < 0.001$ ). Errors bar are standard deviation of three independent experiments..... 31

Figure 4. Survival curve of *Botrytis cinerea* conidia exposed to UV-B radiation on agar medium (strain LQC 150) to different weighted doses of UV-B radiation (Quaita weighted irradiance of  $823 \text{ mW m}^{-2}$  at a different weighted dose)..... 32

Figure 5. A) Biological control ability of *Clonostachys rosea* (LQC 62) against *Botrytis cinerea* (LQC 150) in strawberry leaf disks under UV-B radiation doses from 0 to  $8.9 \text{ KJ m}^{-2}$  (Quaita weighted irradiance of  $823 \text{ mW m}^{-2}$  at a different weighted dose). A) Suppression of *B. cinerea* incidence in leaf disks. *C. rosea* applied at  $10^7$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  (white circle) and at  $10^6$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  (black circle). B) Suppression of *B. cinerea* sporulation in leaf disks. *C. rosea* applied at  $10^7$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  (white circle) and at  $10^6$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  (black circle). Curves show mean values. Graph curves with the same letters

are not significantly different by the Tukey test at 5 % of significance ( $p < 0.001$ ). Errors bar are standard deviation of three independent experiments. .... 33

## CAPÍTULO 2

Figura 1. Irradiância espectral aferida no tratamento do campo utilizando diferentes potências das lâmpadas. Câmara de campo provinha potência de radiação UV-B de 25%, 50%, 75% e 100% conforme as horas do dia, que significam 43, 211, 343 e 443  $\text{mW m}^{-2}$  (segundo Quaité), a altura utilizada foi de 40 cm de distância entre lâmpada e plantas. Cada lâmpada foi coberta com um filtro de acetato de celulose de 0,1 mm de espessura, que bloqueava radiações com comprimento de onda inferior a 290 nm. .... 52

Figura 2. Aplicação do período da manhã a 105 dias após plantio (dap) (data 12/9/2011). Desenvolvimento de *Clonostachys rosea* e *Botrytis cinerea* em discos de folha de morangueiro entre diversos períodos de coleta. A) Presença de *C. rosea*. B) Presença de *B. cinerea*. C) Área dos discos de folha cobertos com conidióforos de *C. rosea*. D) Área dos discos de folha cobertos com conidióforos de *B. cinerea*. Todos os discos de folha foram colocados em placas de Petri contendo o meio Paraquat-Clonorofenicol-Ágar (PCA) para avaliação da esporulação dos fungos nos discos de folha. .... 53

Figura 3. Área abaixo da curva de progresso dos fungos em diferentes tratamentos de radiação UV-B com o antagonista aplicado no período da manhã. A) Área abaixo da curva de progresso da presença de *C. rosea* (AACPPCr). B) Área abaixo da curva de progresso da presença de *B. cinerea* (AACPPBc). C) Área abaixo da curva de progresso da esporulação de *C. rosea* (AACPSCr). D) Área abaixo da curva de progresso da esporulação de *B. cinerea* (AACPSBc). Médias com a mesma letra não diferem entre si segundo o teste de Tukey a 5% de significância ( $p < 0,001$ ). Barra de erro é o desvio padrão de três repetições independentes..... 54

Figura 4. Teste de germinação de conídios de *Clonostachys rosea* aplicado durante o período da manhã em diferentes tratamentos com radiação UV-B em três intervalos de tempo. Germinação dos conídios às 11:00, 13:00 e 17:00 h do dia 105 dias após o plantio (12/09/2011). Barra de erro é o desvio padrão de três repetições independentes. .... 55

Figura 5. Aplicação do período da manhã há 95 dias após plantio (dap) (data 29/8/2011). Desenvolvimento de *Clonostachys rosea* e *Botrytis cinerea* em discos de folha de morangueiro entre diversos períodos de coleta. A) Presença de *C. rosea*. B) Presença de *B. cinerea*. C) Área dos discos de folha cobertos com conidióforos de *C. rosea*. D) Área dos discos de folha cobertos com conidióforos de *B. cinerea*. Todos os discos de folha foram colocados em placas de Petri contendo o meio Paraquat-Clonorofenicol-Ágar (PCA) para avaliação da esporulação dos fungos nos discos de folha ..... 56

Figura 6. Área abaixo da curva de progresso dos fungos em diferentes tratamentos de radiação UV-B com o antagonista aplicado no período da tarde. A) Área abaixo da curva de progresso da presença de *C. rosea* (AACPPCr). B) Área abaixo da curva de progresso da presença de *B. cinerea* (AACPPBc). C) Área abaixo da curva de progresso da esporulação de *C. rosea* (AACPSCr). D) Área abaixo da curva de progresso da esporulação de *B. cinerea* (AACPSBc). Médias com a mesma letra não diferem entre si segundo o teste de Tukey a 5% de significância ( $p < 0,001$ ). Barra de erro é o desvio padrão de três repetições independentes..... 57

### CAPÍTULO 3

Figura 1. A) Altura média (mm) das plantas e (B) tamanho médio das folhas ( $\text{cm}^2$ ) de *Nicotiana benthamiana* em diferentes dias após tratamento (DPT); C) tamanho das lesões de folhas inoculadas com *Botrytis cinerea*. Curvas e barras significam a média dos valores mais desvio padrão de três experimentos independentes. .... 73

Figura 2. RT-PCR dos genes (A) *NbPR-14*, (B) *Nb-AMCM*, (C) Basic *NbPR-2*, (D) *NbPR-1a*, (E) *Nb-CHn* e (F) *Nb-ACC* expressos em folhas de *Nicotiana benthamiana*. Plantas foram inoculadas com *Botrytis cinerea* no dia 23 dias pós tratamento. A quantidade de *NbPR-14*, *Nb-AMCM*, Basic *NbPR-2*, *NbPR-1a*, *Nb-CHn* e *Nb-ACC* mRNA foram determinadas a partir da quantidade relativa de mRNA *NbEF-1 $\alpha$* . Médias são apresentadas com barras de erro padrão calculadas sobre três repetições biológicas e duas replicações. 74

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

Table 1. Strawberry *Botrytis cinerea* strains geographic origin and date of isolation. .... 34

Table 2. Conidia germination of *Botrytis cinerea* strains exposed to different doses of UV-B radiation. Conidia were exposed for 2, 3 and 4 h to UV-B irradiation at a weighted doses of 0 (Control), 5.9, 8.9 and 11.9 KJ m<sup>-2</sup> (Irradiance of 823 mW m<sup>-2</sup>) and incubate for 12, 24 and 36h before evaluation Errors are standard deviation of three independent experiments. .... 35

Table 3. Effects of UV-B radiation on incidence of *Clonostachys rosea* and *Botrytis cinerea*, applied alone or at the same time on leaf disk of strawberry. Means are Area Under Incidence Curve (AUSIC) of the fungus on leaf disks. *C. rosea* applied at 10<sup>7</sup> or 10<sup>6</sup> conidia mL<sup>-1</sup>; *B. cinerea* applied at 10<sup>5</sup> conidia mL<sup>-1</sup>. The disks were exposed to UV-B irradiation at weighted doses of 0 to 8.9 KJ m<sup>-2</sup> (Irradiance of 823 mW m<sup>-2</sup>). Errors are standard deviation of three independent experiments. .... 36

Table 4. Effects of UV-B radiation on sporulation of *Clonostachys rosea* and *Botrytis cinerea*, applied alone or at the same time on leaf disk of strawberry. Means are Area Under Sporulation Curve (AUSC) of the fungus on leaf disks. *C. rosea* applied at 10<sup>7</sup> or 10<sup>6</sup> conidia mL<sup>-1</sup>; *B. cinerea* applied at 10<sup>5</sup> conidia mL<sup>-1</sup>. The disks were exposed to UV-B irradiation at weighted doses of 0 to 8.9 KJ m<sup>-2</sup> (Irradiance of 823 mW m<sup>-2</sup>). Errors are standard deviation of three independent experiments. .... 37

### CAPÍTULO 2

Tabela 1. Sistema eletrônico de funcionamento das lâmpadas, que mudava a potência conforme as horas do dia. Médias da irradiação seguindo o método de Quate et al., (1992). .... 58

Tabela 2. Comparação do desenvolvimento de <i>Clonostachys rosea</i> e <i>Botrytis cinerea</i> em discos de folha entre os diferentes intervalos de aplicação (Manhã e Tarde) nos diferentes tratamentos de radiação UV-B. ....	59
---	----

### **CAPÍTULO 3**

Tabela 1. Primers utilizados para a amplificação de NbEF1 $\alpha$ (controle) e genes relacionados a SAR em <i>Nicotiana benthamiana</i> tratados com ácido para-aminobenzóico (PABA).....	75
--	----

## 1. RESUMO

A incidência de radiação ultravioleta (UV 100 a 400 nm) na terra, em especial a radiação UV-B (280-320 nm), por ser filtrada exclusivamente pela camada de ozônio e apresentar grande efetividade biológica, quando comparada com os outros espectros da radiação UV, está sendo alterada com as mudanças climáticas. Sendo a radiação solar um importante componente climático durante o desenvolvimento de um microrganismo no ambiente, se fez necessário avaliar a tolerância de fitopatógenos, bem como de agentes de biocontrole à radiação UV-B. Assim, o presente trabalho teve como objetivos estudar alguns aspectos da interação morangueiro  $\times$  *Botrytis cinerea*  $\times$  *Clonostachys rosea*  $\times$  radiação UV-B. Nos estudos foram observadas diferenças significativas entre os 13 isolados de *B. cinerea* em relação a germinação de esporos e esporulação em discos de folhas de morango após irradiação com UV-B de 2,9 a 8,9 KJ m<sup>-2</sup>. A germinação relativa variou de 75% a 95% e a esporulação variou em mais do que 100% entre os isolados de *B. cinerea* após exposição à radiação UV-B de 6,4 KJ m<sup>-2</sup>. O isolado LQC-150 de *B. cinerea* apresentou maior germinação e esporulação em discos de folhas após irradiação e foi selecionado como o mais tolerante. O isolado LQC-150 de *B. cinerea* apresentou LD<sub>50</sub> de 6,2KJ m<sup>-2</sup>. A esporulação de ambos os fungos em discos de folhas de morangueiro, quando inoculados individualmente, foi inversamente proporcional

à dose de radiação UV-B. Quando desafiados na mesma folha e não irradiados, *C. rosea* reduziu a incidência do patógeno e a esporulação em 50% e 80%, respectivamente. A capacidade de *C. rosea* em controlar o patógeno nos discos foliares foi gradualmente reduzida com o aumento da radiação UV-B, sendo de 20% e 50%, respectivamente, para a incidência do patógeno e a esporulação, em maiores doses de UV-B. Em campo, houve uma redução da disseminação e da esporulação de *C. rosea* nas plantas submetidas a UV-B aumentado, conseqüentemente reduzindo a capacidade do fungo em controlar *B. cinerea*. Aplicações de *C. rosea* durante diferentes horários do dia mostraram resultados distintos, com a aplicação no período da manhã houve menor desenvolvimento de *C. rosea* quando comparado com a aplicação no final de tarde. Também foi estudado o potencial do ácido 4-aminobenzóico (PABA) em induzir resistência de plantas de *Nicotiana benthamiana* a *B. cinerea* e foi verificado que plantas tratadas com PABA foram mais resistentes ao patógeno. PABA não interferiu em nenhum parâmetro de crescimento das plantas. PABA induziu um aumento da expressão relativa de diversos genes de defesa de *N. benthamiana* tais como: *NbPR-14*, *Nb-AMCM*, *NbPR-1a*, *Nb-CHn* e *Nb-ACC* ao passo que o gene basic *Nb-PR2* não apresentou diferença na sua expressão em plantas de *N. benthamiana* tratadas com PABA.

EFFECT OF UV-B RADIATION IN THE INTERACTION OF *Botrytis cinerea* – *Clonostachys rosea* ON STRAWBERRY AND THE EFFECT OF ACID 4-AMINOBENZOIC IN THE CONTROL OF THIS PATHOGEN ON TABACCO

Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: LÚCIO BERTOLDO COSTA

Adviser: WAGNER BETTIOL

## 2. SUMMARY

The incidence of ultraviolet (UV 100 to 400 nm) in the earth, especially UV-B radiation (280-320 nm) is being altered with climate change. The solar radiation is an important component for the development of microorganism in the environment, thus is important evaluate the tolerance of plant pathogens as well as the biocontrol agents to UV-B radiation. The present study aimed to study the interaction of strawberry x *Botrytis cinerea* x *Clonostachys rosea* x UV-B radiation. There were significantly differences among the thirteen *B. cinerea* strains in relation to spore germination and sporulation on leaf disks after irradiation ranging from 2.9 to 8.9 KJ m<sup>-2</sup>. The relative germination ranged from 95 to 75% and the sporulation varied more than 100% among *B. cinerea* strains after exposure to

radiation of  $6.4 \text{ KJ m}^{-2}$ . The LQC-150 strain showed high germination and sporulation on leaf disk after irradiation and was selected as a tolerant strain. Survival curve of *B. cinerea* strain LQC-150 showed lethal dose 50 ( $\text{LD}_{50}$ ) of  $6.2 \text{ KJ m}^{-2}$ . The sporulation of both fungi on leaf disks was inversely proportional to the dose of UV-B radiation, while inoculated alone. When confronted in the same leaf disk and not irradiated, *C. rosea* reduced the incidence of the pathogen and its sporulation in about 50% and 80%, respectively. However, the ability of *C. rosea* to control *B. cinerea* on leaf disks was gradually reduced with the increase of UV-B radiation, reaching 20% and 50%, respectively for pathogen incidence and sporulation, on higher UV-B doses. When the bioagent was applied in the morning, the development was lower than when applied afternoon. The effect of PABA in the induction of resistance in plants of *Nicotiana benthamiana* against *B. cinerea* was evaluated and it was found that plants treated with PABA were more resistant to the pathogen. The evaluations of size of plants and leaves showed that PABA did not interfere in the growth parameters. PABA was able to induce an increase of relative expression of many genes of defense in *N. benthamiana* such: *NbPR-14*, *Nb-AMCM*, *NbPR-1a*, *Nb-CHN* e *Nb-ACC* while the gene basic *Nb-PR2* did not show difference in its expression in *N. benthamiana* plants treated with PABA.

### 3. INTRODUÇÃO

O aumento nas concentrações de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), metano (CH<sub>4</sub>), monóxido de carbono (CO), óxido nitroso (N<sub>2</sub>O), óxido de nitrogênio (NO<sub>x</sub>) e ozônio (O<sub>3</sub>), gases relacionados ao efeito estufa, está causando mudanças climáticas que recebem grande destaque na mídia e são objetos de estudo de muitos pesquisadores (GHINI et al., 2008). Além disso, não está prevista a redução da concentração de nenhum desses gases em curto prazo, antevendo que os habitantes do planeta Terra sofrerão as consequências dessas mudanças de clima por muitos anos (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 biológicas entre patógeno e hospedeiro, ocasionando maiores problemas com pragas e doenças (COAKLEY et al., 1999; MCELRONE et al., 2010). Em decorrência das mudanças previstas, será necessário, rever técnicas agrícolas que podem perder a eficácia e tornar a agricultura ainda mais dependente de agroquímicos para suprir as adversidades previstas, resultando em maior custo na produção e, conseqüentemente, em toda a cadeia consumidora (HANNUKKALA et al., 2007).

Outro 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 por essa camada (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 para a 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). Os efeitos danosos da radiação ultravioleta sobre diferentes organismos e todas as alterações moleculares e celulares decorrentes desse processo (SCHADE et al., 2005). A camada de ozônio está sendo reduzida, paulatinamente, em consequência das atividades antrópicas. Alguns cientistas acreditam que essa perda da camada de ozônio foi 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 polos do globo, resultando em perdas acentuadas de ozônio nessas regiões (TANHUA et al., 2009). Assim, surgiram falhas nessa camada conhecidas como “buracos na camada de ozônio” (JOHNSON, 2003). Os primeiros trabalhos, relativos ao buraco na camada de ozônio, foram na década de 80 com Chubachi e Farman (GODIN-BEEKMANN, 2010).

Com a intenção de mitigar o efeito de gases sobre a camada de ozônio foi elaborado o Protocolo de Montreal que visa à redução gradual e/ou substituição do gás CFC e outros gases por gases não nocivos ao ozônio. Mesmo assim, pesquisadores afirmam que os níveis de ozônio subirão novamente a partir da metade do século 21 (HADER et al., 2003), fazendo com que os habitantes da Terra sofram com os efeitos da redução da camada de ozônio por algumas décadas (MCKENZIE et al., 2007; GODIN-BEEKMANN, 2010).

Com essa perspectiva de futuro, faz-se necessário conhecer 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

(MADRONICH et al., 1998), é necessário estudar o efeito sinérgico com o aquecimento global (IPCC, 2007).

Dessa forma, é indispensável estudar os possíveis efeitos das mudanças climáticas sobre diferentes aspectos da agricultura, sendo um desses problemas os relacionados com as doenças de plantas. O fitopatógeno *Botrytis cinerea*, causador de importantes perdas agrícolas, ataca diferentes culturas e é, basicamente controlado com fungicidas químicos. Recentemente, o agente de biocontrole *Clonostachys rosea* tem sido utilizado para controlar esse patógeno, com o objetivo de reduzir o uso de pesticidas na agricultura. Como o patógeno e o agente de biocontrole são sensíveis às condições climáticas, é importante estudar os efeitos das mudanças climáticas sobre esses organismos e suas interações. Dentro dessas mudanças, como demonstrado anteriormente, a radiação UV-B pode interferir em todas as fases da interação entre esses organismos, bem como com a planta cultivada.

O presente trabalho teve por objetivo estudar a interação morangueiro  $\times$  *Botrytis cinerea*  $\times$  *Clonostachys rosea* e também avaliar o efeito de ácido 4-aminobenzóico (PABA) como redutor de doenças causadas por *B. cinerea* em plantas de *Nicotiana benthamiana*. Para tanto, a tese foi dividida em três capítulos, intitulados: 1) UV-B radiation reduces biological control ability of *Clonostachys rosea* against *Botrytis cinerea*; 2) Efeito da radiação ultravioleta-B no desenvolvimento de *Clonostachys rosea* em condições de campo e no antagonismo a *Botrytis cinerea*; e 3) Redução da doença causada por *Botrytis cinerea* com o uso de ácido para-aminobenzóico (PABA). Os artigos foram redigidos conforme as normas dos periódicos: 1) Environmental Microbiology; 2) Biological Control; e 3) Tropical Plant Pathology, respectivamente.

## **4. REVISÃO DE LITERATURA**

### **4.1 O patógeno e a Doença**

*Botrytis cinerea* 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-cinzento, sendo uma das mais destrutivas em sistemas de cultivo protegido. Culturas como a roseira, o morangueiro, o tomateiro, o crisântemo e o eucalipto são atacadas por esse patógeno (GULLINO et al., 1989).

Na Nova Zelândia, acredita-se que um quinto da produção comercial de morangos seja perdido devido às doenças causadas por fungos, sendo o mofo-cinzento o principal agente etiológico (TIMUDO-TORREVILLA et al., 2005). O fungo causa perdas de, até, 50% na cultura do morango em campo (BLANCO et al., 2006). Esse patógeno é capaz de atacar o morango durante o seu desenvolvimento, no período da colheita, no transporte e durante o comércio da fruta (CARD et al., 2009). Todas as partes da planta são suscetíveis ao patógeno, desde frutos, hastes, folhas e flores (SUTTON, 1990). Os tecidos senescentes servem como meio de desenvolvimento do patógeno e assim colaboram com o aumento do inóculo nas condições e cultivo (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 se expressará apenas após o amadurecimento do fruto (POWELSON, 1960).

Esse patógeno cresce abundantemente 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 a partir dos conídios e o crescimento do patógeno ocorre em temperatura superior a 10 °C, porém, a temperatura ótima está em torno de 25 °C (JARVIS, 1989).

Assim, 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, reduzir a infecção pelo patógeno (JARVIS, 1989). Medidas fitossanitárias como a eliminação de restos culturais, diminuindo a pressão de inóculo do patógeno, são recomendadas. O aumento do espaçamento entre plantas formando um dossel menos denso, permite maior penetração da luz e, conseqüentemente, a redução da senescência precoce das folhas mais baixas e a redução dos sítios favoráveis à infecção do patógeno. A solarização, também, pode ser utilizada como medida de controle do patógeno e redução de inóculo no solo (LOPEZ-HERRERA et al., 1994).

Durante muitos anos o controle do mofo-cinza foi realizado com sucesso, exclusivamente, com fungicidas durante o florescimento das culturas (MERTELY et al., 2002). Entretanto, em várias partes do mundo foram relatadas estirpes do patógeno com resistência aos fungicidas utilizados (TIMUDO-TORREVILLA et al., 2005; BARDAS et al., 2008). Isto tem levado a uma aplicação em intervalos cada vez menores, com concentrações maiores de ingredientes ativos e, também, mistura de princípios ativos (NORTHOVER e MATTEONI, 1986; GULLINO et al., 1989; CARD et al., 2009), com crescentes problemas de resíduos de agrotóxicos nos frutos para consumo (RABOLLE et al., 2006). O controle com cultivares resistente não tem sido efetivo, em decorrência de o patógeno apresentar grande variabilidade genética e ser um fungo 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 (TRONSMO e DENNIS, 1977; PENG e SUTTON, 1991; SWADLING e JEFFRIES, 1996; BOFF et al., 2002; COTA et al., 2008; CARD et al., 2009). Atualmente, existem diversos agentes de biocontrole de *B. cinerea* entre eles: *Trichoderma harziarum* (ELAD et al., 1993; FREEMAN et al., 2004) et al., 2004), *Clonostachys rosea* (PENG e

SUTTON, 1991), *Pseudomonas cepacia* (HAMMER et al., 1993) e *Bacillus subtilis* (TATAGIBA et al., 1998).

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* no controle do patógeno.

#### 4.2 *Clonostachys rosea*

*Clonostachys rosea* [(sin. *Gliocladium roseum*: teleomorfo *Bionectria ochroleuca*) (SCHROERS et al., 1999)] é encontrado comumente como fungo saprófita de solo com distribuição cosmopolita (SCHROERS, 2001). Ele é conhecido como agente de biocontrole de muitos fitopatogênicos, incluindo *B. cinerea*, *Didymella rabiei*, *Alternaria radicina* e *Alternaria dauci* (VICCINI et al., 2009). Um isolado de *C. rosea* (ACM941) controlou o complexo da podridão das raízes em ervilha, (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 sua ação como fungo entomopatogênico de duas espécies de lepidópteros: *Oncometopia tucumana* e *Sonesimia grossa* (TOLEDO et al., 2006).

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

Esse agente de biocontrole é eficiente na cultura do morangueiro em cultivo protegido, em virtude do antagonismo apresentado a *B. cinerea*. A sua 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 foi demonstrada por diversos autores (PENG e SUTTON, 1991; SUTTON e PENG, 1993). *C. rosea* coloniza, sem expressão de sintomas, raízes, hastes, vagens e sementes de soja (MUELLER e SINCLAIR, 1986) e 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 que o patógeno (MORANDI et al., 2003; MORANDI et al., 2006). No Brasil, são promissores os resultados com *C. rosea* controlando o mofo-cinza em morango, sendo mais eficiente que fungicida em condições de campo (COTA et al., 2008).

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 e PENG, 1993).

### **4.3 Radiação ultravioleta-B**

A estação do ano, a latitude, a longitude, a duração do fotoperíodo e as nuvens influenciam fortemente na irradiância local de UV-B na Terra (MADRONICH e DEGRUIJL, 1993). A irradiância de UV-B na Terra também aumenta com a altitude (CABRERA et al., 1995) e diminui com o aumento da latitude (PIAZENA, 1996). A radiação UV-B em mar aberto pode penetrar até 30 metros de profundidade, enquanto que em ambientes litorâneos esse número pode aumentar dependendo das propriedades físico-químicas da água (TEDETTI e SEMPERE, 2006). Com isso, o fitoplâncton da zona eufótica, que é a base alimentar no ambiente marítimo, pode sofrer alterações (mutações) resultando em diminuição da pigmentação e aumento da permeabilidade celular resultando em menor absorção de nutrientes (SOBRINO et al., 2004). Existem estudos sobre exposições de macroalgas a radiação UV-B artificial aumentada, mostrando que há diminuição de fotossíntese; menor absorção de nitrogênio, crescimento e capacidade reprodutiva, e, principalmente, dano ao DNA (HOLZINGER e LUTZ, 2006). Entretanto, esses resultados podem se intensificar quando se utilizam estádios juvenis dessas algas durante a avaliação (AMILS et al., 2007).

Para plantas existe uma quantidade considerável de trabalhos mostrando os danos da radiação UV-B, que é absorvida por biomoléculas como proteínas, pigmentos e ácidos nucleicos. Assim, a elevação da radiação UV-B pode resultar em degradação acelerada destas biomoléculas (CALDWELL e FLINT, 1994; CALDWELL et al., 1998). Todas essas reações resultarão em diminuição de produção de importantes

culturas (KOTI et al., 2005; MOHAMMED e TARPLEY, 2010), principalmente, pela redução da capacidade fotossintética (ZHAO et al., 2004), alterações nos estádios fenológicos e até mesmo pela diminuição da reprodução (PHOENIX et al., 2001; MOHAMMED e TARPLEY, 2010).

A radiação UV-B também reduz o crescimento das plantas, em virtude do estresse provocado pela formação de compostos de defesa (GERM et al., 2010; JAAKOLA e HOHTOLA, 2010) que visam proteger seu DNA desses efeitos (ROZEMA et al., 1997). Ballaré (2003) demonstrou que o estresse da planta pela radiação UV-B pode deixá-la mais resistente ao estresse de origem abiótica. Por outro lado, existe o efeito estimulante da radiação UV-B na expressão de genes de resistência de plantas a fitopatógenos (KUNZ et al., 2006; ANTOGNONI et al., 2007). Entretanto, isso pode variar conforme a planta, cultivar e local do ensaio (PAUL e 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 alteradas 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 dessas moléculas nesse novo ambiente.

Segundo Alvarado-Gutierrez et al. (2008), plantas de feijão têm a expressão de genes de resistência aumentada quando essas são expostas a doses de radiação UV-B tornando-as plantas mais resistentes a *Colletotrichum lindemuthianum*. O mesmo resultado foi observado por Kunz et al. (2008), utilizando *Arabidopsis thaliana* e o patógeno *Hyaloperonospora parasitica*. Entretanto, nenhum dos autores concluiu se o tipo de resistência foi local ou sistêmica. Ensminger (1993) demonstrou que a radiação ultravioleta atua diretamente na indução da esporulação de patógenos. 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, pode haver alteração na incidência de doenças, pois, a esporulação de diversos patógenos é reduzida (HONDA et al., 1977; NICOT et al., 1996). Entretanto, acredita-se que aumentos de baixa intensidade de radiação UV, aumentam a esporulação de fungos e

aumentos drásticos da radiação UV inibam a esporulação de fungos (LEACH e TRIONE, 1966).

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).

A radiação solar é um fator que interfere durante a aplicação de um agente de controle biológico a campo (BRAGA et al., 2001). As radiações UV-A e UV-B podem inativar propágulos dos agentes de biocontrole em poucas horas de exposição, em decorrência de mudanças genéticas e morfológicas, resultando em perda da eficácia/eficiência do agente de biocontrole (BRAGA et al., 2001). 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). Assim, é necessário avaliar a tolerância de isolados de agentes de controle biológico à radiação UV-B. Para *Metarhizium* spp. existe uma gama considerável de trabalhos, por ser amplamente utilizado na agricultura para controle de insetos pragas, principalmente, em regiões produtoras de cana-de-açúcar e pastagens. O efeito da radiação UV-B deve ser também estudado para outros microrganismos como, por exemplo, *Clonostachys rosea*. Com isso, foi buscado avaliar o efeito da radiação UV-B em *C. rosea*, agente de controle biológico de doenças de plantas.

#### **4.4 Ácido 4-aminobenzóico**

O ácido 4-aminobenzóico (também conhecido como ácido para-aminobenzóico ou PABA) é um composto orgânico com fórmula molecular  $C_7H_7NO_2$ . PABA tem sido referido como uma vitamina do grupo B (AKBEROVA, 2002). No entanto, muitos pesquisadores não consideram essa substância como uma vitamina, porque ela não é considerada essencial para humanos. Em medicina, PABA é utilizada como fármaco para proteção contra a radiação ultravioleta e também utilizado em testes de diagnóstico de estado de trato gastrointestinal (KOSTIC et al., 1992; MACKIE e MACKIE, 1999).

PABA é conhecido como componente químico desde 1863 e como medicamento com propriedades de vitamina desde 1939. Novas propriedades do PABA têm sido descritas recentemente. A mais importante delas, é a capacidade de induzir a síntese de interferon, que foi descoberta ao estudar seu efeito antiviral (AKBEROVA, 2002). A capacidade de efeito antiviral de PABA foi baseada na sua capacidade de reestabelecer a atividade de DNase e RNase parcialmente inativado (KOZHEVNIKOVA e RAPOPORT, 1986; KOZHEVNIKOVA e RAPOPORT, 1987). Já são relatadas doenças virais que foram controladas ou atenuadas com a utilização de PABA na saúde humana (AKBEROVA, 2002). Ainda na medicina, PABA é comumente utilizada como droga protetiva contra distúrbios de pele, como a doença de Peyronie, sob o nome de Potaba (OSGOOD et al., 1982).

Em plantas, muitas vitaminas têm sido relatadas como indutores químicos da resistência sistêmica adquirida (SAR). Além disso, não são tóxicas e tem baixo custo (LYON, 2007). As vitaminas B1 (tiamina), B2 (riboflavina) e K3 (menadiona) induziram SAR em plantas de *Arabidopsis*, arroz, pepino e tabaco contra doenças fúngicas, bacterianas e virais (DONG e BEER, 2000; AHN et al., 2005). A riboflavina é produzida por muitas espécies de plantas e bactérias e foi relatada promovendo mecanismos de defesa das plantas contra um patógeno biotrófico, vírus do mosaico do tabaco (TMV), o patógeno hemi-biotrófico *Phytophthora parasitica* e *Ralstonia solanacearum* (DONG e BEER, 2000; LIU et al., 2010; TAHERI e TARIGHI, 2011). Na China, PABA foi relatado controlando doenças fúngicas, mas a indução de resistência e a expressão genica não foram estudadas em detalhe (KELMAN e COOK, 1977). O papel potencial de PABA como elicitador de SAR necessita ser melhor investigado. Já foi descrito que PABA foi capaz de induzir SAR contra a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* em mudas de pimenta em condições de casa de vegetação mostrando significativa diferença de sintomas em plantas tratadas (SONG et al., 2013).

No arroz, a aplicação de riboflavina (vitamina B2) aumenta a resistência sistêmica adquirida contra *Rhizoctonia solani* (TAHERI e TARIGHI, 2010). Em mudas de tabaco a aplicação de riboflavina protege contra *Ralstonia solanacearum* e *Phytophthora parasitica* por induzir uma resposta oxidativa, e a expressão de genes relacionados com a defesa além de um acúmulo de compostos fenólicos, como escopoletina e lignina (LIU et al., 2010).

Uma série de estudos tem relatado que indutores químicos de SAR como BTH, SA e PABA tem um efeito negativo sobre o crescimento e a produtividade das plantas (HEIL et al., 2000; DIETRICH et al., 2004; ALEANDRI et al., 2010). No estudo de Song et al., (2013) por exemplo, observou-se uma inibição quase completa da produção de frutos de pimenta, em condições de campo, devido a aplicações de PABA (SONG et al., 2013).

## **CAPÍTULO 1**

### **UV-B RADIATION REDUCES BIOLOGICAL CONTROL ABILITY OF *Clonostachys rosea* AGAINST *Botrytis cinerea***

Esse artigo foi redigido de acordo com as normas da revista Environmental Microbiology.

## RESEARCH ARTICLE

UV-B radiation reduces biological control ability of  
*Clonostachys rosea* against *Botrytis cinerea*

Lúcio B. Costa<sup>1,3</sup>; Marcelo A.B. Morandi<sup>2</sup>; Wagner Bettiol<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) CEP 18.610-307 - Botucatu, SP, Brazil.

<sup>2</sup> Embrapa Environment, CP 69, 13820-000 Jaguariúna, SP, Brazil.

\*To whom correspondence should be addressed: Phone: 55.19 3311-2662, Fax: 55.19 3311-2740, email: wagner.bettiol@embrapa.br

September 24, 2014

## Abstract

The sensitivity to UV-B radiation is one of the most important limitations of fungus dispersal by conidia in field. There are several information about the effects of UV-B radiation on biological control agents. However, there is a lack of studies comparing the tolerance of conidia of biological control agents against plant pathogens. The aim of this study was to evaluate the effects of UV-B radiation on *Botrytis cinerea* strains and its interactions with a previously selected UV-B tolerant strain of the biological control agent *Clonostachys rosea*. There were significantly differences among the thirteen *B. cinerea* strains in relation to spore germination and sporulation on leaf disks after irradiation ranging from 2.9 to 8.9 KJ m<sup>-2</sup>. The relative germination ranged from 95 to 75% and the sporulation varied more than 100% among *B. cinerea* strains after exposure to radiation of 6.4 KJ m<sup>-2</sup>. The LQC-150 strain showed high germination and sporulation on leaf disk after irradiation and was selected as a tolerant strain. Survival curve of *B. cinerea* strain LQC-150 showed lethal dose 50 (LD<sub>50</sub>) of 6.2 KJ m<sup>-2</sup>. The sporulation of both fungi on leaf disks was inversely proportional to the dose of UV-B radiation, while inoculated alone. When confronted in the same leaf disk and not irradiated, *C. rosea* reduced the incidence of the pathogen and its sporulation in about 50% and 80%, respectively. However, the ability of *C. rosea* to control *B. cinerea* on leaf disks was gradually reduced with the increase of UV-B radiation, reaching 20% and 50%, respectively for pathogen incidence and sporulation, on higher UV-B doses.

**Keywords:** Climate change, Conidial UV-B tolerance, Ultraviolet radiation.

## Introduction

*Botrytis cinerea*, the causal agent of the gray mold disease, is a necrotrophic cosmopolitan fungi, able to attack more than 200 plant genera (Jarvis, 1989). The pathogen causes losses of up to 50% on strawberry field (Blanco et al., 2006) and can causes losses in post-harvest (Card et al., 2009). All parts of the strawberry plants are susceptible to the pathogen. Senescent fruits, stems, leaves and flowers serves as primary inoculum sources for epidemics (Guetsky et al., 2001).

Biological control has shown to be a promising tactic to control gray mold in several crops (Tronsmo and Dennis, 1977; Peng and Sutton, 1991; Swadling and Jeffries, 1996; Boff et al., 2002; Cota et al., 2008a; Cota et al., 2008b; Card et al., 2009). Among

biocontrol agents, *Clonostachys rosea* has been shown to be highly effective against the pathogen in strawberry. According to Peng and Sutton (1991), isolates of *C. rosea* suppressed by up to 98% the disease in greenhouse tests with efficiency equal to or greater than the standard fungicide for disease control. The biocontrol agent can efficiently compete for space and nutrients and, thus suppress the pathogen sporulation.

Sensitivity to solar radiation is one of the limitations for applying biocontrol agents in the field (Braga et al. 2001b; Li and Feng 2009; Morandi et al. 2006). The solar ultraviolet radiation can be conventionally classified by the wavelengths. The UV-B radiation, comprising wavelengths of 280 to 315 nm is only partially filtered by the ozone layer and has significant biological effects (Madronich et al., 1998). The effects of UV-B radiation have been studied only for few biocontrol agents, including *Metarhizium anisopliae* and *C. rosea* (Braga et al., 2001a; Rangel et al., 2005; Costa et al., 2012; Costa et al., 2013). The UV-B radiation may inactivate propagules of the fungus in a few hours of exposure, due to genetic and morphological changes, resulting in loss of efficiency of the biocontrol agent application (Braga et al., 2001b).

UV-B radiation reduces the conidia germination and the growth and sporulation of *C. rosea* on leaf disks (Costa et al., 2012; Costa et al., 2013). The growth of the fungus is influenced by the dose of UV-B radiation and the conidial concentration applied. The reduction of *C. rosea* colonization results in a loss of the ability of *C. rosea* to compete and control *B. cinerea* on plant tissues. However, Costa et al. (2012) verified difference of UV-B radiation tolerance among *C. rosea* strains, and a more tolerant strain (LQC 62) was selected. The aim of this present study was to evaluate the effects of UV-B radiation on *Botrytis cinerea* strains and its interactions with the previously selected UV-B tolerant strain of the biological control agent *Clonostachys rosea*.

## **Materials and methods**

### **Irradiation chambers, lamps, and filters**

Irradiation experiments were conducted in a temperature-controlled room with four UV-B 313EL lamps (Q-lab Cleveland, OH). The lamps were aged prior to the start of the experiments, resulting in a stable level of irradiation. The temperature inside the chamber was adjusted to  $22 \pm 2$  °C and was verified periodically throughout the sequence of experiments. Controlled room temperature was allowed to equilibrate for 1 h prior to all experiments. Every lamp was covered with a 0.13 mm-thick cellulose diacetate film

(Málaga Ltda), which had a cutoff point at 290 nm. This permitted the passage of most UV-B and UV-A (290 – 400 nm), but prevented exposure to UV-C (< 280 nm) and short-wavelength UV-B (< 290 nm). Control-plates inside each of the chambers were wrapped with aluminum foil and thus physically protected from radiation. The Petri dishes were randomized at intervals of 30 minutes to homogenize the received doses of UV-B radiation.

The DNA damage action spectrum developed by Quaité et al. (1992) and normalized to unity at 300 nm was used to calculate the weighted UV irradiances ( $\text{mW m}^{-2}$ ). This spectral weighting was selected based on the spectral characteristics of nine fungal responses reviewed by Paul et al. (1997), who concluded that this DNA damage spectrum is closely approximated to the fungal responses. All the light measurements were made with a spectroradiometer (Ocean Optics model USB2000 + rad) connected to a portable computer. The spectral irradiances of the lamp setups used for the different UV treatment is shown in Figure 1.

### **Evaluation of conidial germination and sporulation**

Thirteen *B. cinerea* strains were obtained from strawberry plants in the main production areas of São Paulo State, Brazil (Table 1) and deposited in the Embrapa Environment Collection of Microorganisms.

For germination test, the fungus strains were grown on potato-dextrose-agar media (PDA, Acumedia Manufacturers, Michigan) in Petri dishes (polystyrene, 90 x 10 mm, Pleion) and incubated at  $17 \pm 2$  °C and 12 h light/12 h dark for 21 days. Conidial suspensions were prepared in Tween 80 solution with distilled water (0.01% v/v), vigorously shaken in a vortex and filtered through a polycarbonate membrane (80 mm diameter, 8  $\mu\text{m}$  pore size, Whatman Nucleopore, Clifton, NJ, USA) to remove spore aggregates. Conidial concentrations were estimated by hemocytometer counts and dilutions made Tween 80 solution (0.01% v/v) for immediate use in the irradiation and germination studies.

Conidial suspensions (20  $\mu\text{l}$ ,  $10^5$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ ) were placed on 7 ml-agar medium (PDA + 0.002% benomyl with 25% of active ingredient; Hi-yield Chemical, Bonham, TX) in Petri dishes (polystyrene, 50 x 10 mm, Pleion) for evaluation of germination. The benomyl has little effect on the germination of the fungus and was used to reduce the speed of growth of the germinative tube, preventing hypha superposing to allow monitoring of

the germination for a longer time (Milner et al., 1991).

The germination was interrupted with lactofenol + 0.05% tripan blue. Germination was observed with 400 × magnification in an optic microscope. Conidia with a germ tube longer than the diameter of the conidia were considered germinated. A total of 300 conidia per treatment were evaluated. Relative percent germination after each period of incubation was calculated by the equation:

$$\text{Relative germination (\%)} = (W_t/W_c) \times 100;$$

Where  $W_t$  is the number of germlings at exposure time  $t$  and  $W_c$  is the number of germlings of the control plate (Braga et al., 2001a).

To estimate the *B. cinerea* sporulation, 1-cm-diameter leaf disks of strawberry plants (cv. Oso-grande), between 30 and 60 days after emergence, were used. The disks were surface sterilized in 70 % ethanol (1 min) followed by 2 % sodium hypochlorite (1 min). Disks were washed in sterile distilled water, placed to dry within a laminar flow and subsequently placed in Petri dishes (10 × 90 mm, Pleion) containing paraquat-chloramphenicol-agar media (PCA) (Peng and Sutton, 1991). On each plate, 10 leaf disks were arranged.

Each disk received an aliquot suspension (20 µL) of *B. cinerea* strains at  $10^5$  conidia mL<sup>-1</sup> concentration. Sporulation was estimated after the plates were incubate at  $22 \pm 2$  °C (12 h light/12 h dark) for evaluation at 3, 7 and 10 days. The evaluation was accomplished following a scale of notes for the area of the disks covered with conidiophores of fungus, as follow such as: 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%), and 7=90% (77-100%) (Peng and Sutton, 1991). For evaluation of *C. rosea* sporulation the following scale of notes for the area of the disks covered with conidiophores of the fungus, was used: 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%), and 7 = 94% (88–100%) (Morandi et al., 2000).

### **Establishment of the appropriate irradiance and incubation period to evaluate spore germination.**

*Botrytis cinerea* were prepared and placed on PDA + benomyl in plates as described and exposed to irradiance of 823 mW m<sup>-2</sup> of UV-B radiation (Figure 1). The Petri dishes were positioned at 18 cm from the lamps and exposed to 2, 3 or 4 h of UV-B radiation, corresponding to doses of 5.6, 8.7, and 11.6 KJ m<sup>-2</sup>, respectively. After

irradiated, the Petri dishes were incubated at  $25 \pm 2$  °C, in the dark and the germination of the conidia were evaluated at 12, 24, and 36 h after UV-B radiation treatment. Once the appropriate period of incubation for germination evaluation was established, thirteen *B. cinerea* strains were compared for their tolerance to UV-B radiation, following the same methodology for germination and sporulation measurements.

#### **Survival curve of tolerant *Botrytis cinerea* strain conidia exposed to UV-B radiation.**

To establish the survival curve of the most UV-B radiation tolerant *B. cinerea* strain, conidia of the fungus was placed in plates containing PDA + benomyl and exposed to UV-B radiation (irradiance  $823 \text{ mW m}^{-2}$ ) for 0 to 6 h, corresponding to 0 (control), 2.9, 5.8, 8.7, 11.6, 14.5, and  $17.4 \text{ KJ m}^{-2}$ . After irradiation, the plates were kept at  $22 \pm 2$  °C in the dark until the evaluation of germination after 24 h of incubation.

#### **Confrontation of *Clonostachys rosea* and *Botrytis cinerea* under UV-B radiation in strawberry leaf disks.**

The *C. rosea*, strain LQC 62, previously selected as UV-B radiation tolerant (Costa et al., 2012), and the tolerant *B. cinerea* selected on this study were confronted in strawberry leaf disks. After prepared as above described, the leaf disks were placed in disposable plates ( $10 \times 90$  mm, Pleion) over humidified absorbent paper (5 ml of sterilized water) (Morandi et al., 2000). In each plate, 19 disks were placed and organized into five rows. After that, each disk received an aliquot of 20  $\mu\text{L}$  of *B. cinerea* conidia suspension at  $10^5$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  or 20  $\mu\text{L}$  of *C. rosea* conidia suspensions at  $10^6$  or  $10^7$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  respectively. For confrontation treatments, both fungi were applied to the same disk at final concentrations of each fungus as above.

Thereafter, the disks were exposed to UV-B radiation (irradiance  $823 \text{ mW m}^{-2}$ ) for 0 to 3 h, corresponding dose to 0 (control), 2.9, 5.9 e  $8.9 \text{ KJ m}^{-2}$ . After irradiation, the disks were transferred to paraquat-chloramphenicol-agar medium (PCA) in Petri dishes (Peng and Sutton, 1991). Sporulation of the fungi was estimated after the tissues were incubated at  $22 \pm 2$  °C (12 h light/12 h dark) for 3, 7, and 10 days, as describe.

## **Experimental design and data analysis**

Each experiment was conducted with a completely randomized design and repeated three times. For conidia germination experiments, there were two plates as replicates for each treatment. A factorial arrangement was used to evaluate the interactions between lengths of exposure of UV-B radiation, for *B. cinerea* germination study. When there were no significant interactions among factors, the data were grouped for analysis. For evaluations on leaf disks, there were three replication plates each containing 10 disks. The data from the three experimental repetitions invariably resulted in treatment effects in the same significance classes. Therefore, the data were grouped for analyses. Statistical computations were performed using the Statistical Analysis Systems (SAS Institute Inc., Cary, NC). Data for conidial germination and fungal sporulation were transformed when necessary and examined using analysis of variance (ANOVA). The Area Under Incidence Curve (AUIC) and the Area Under Sporulation Curve (AUSC) for the fungus on leaf disks were calculated and treatment means were compared by Tukey test.

## **Results**

### **Establishment of the appropriate irradiance and incubation period to evaluate spore germination.**

The conidia germination of *B. cinerea* strains was inversely proportional to the irradiance dose (Table 2). The average germination at irradiance dose of  $5.9 \text{ KJ m}^{-2}$  was 70.4 and 79.6% after 24 and 36 h of incubation, respectively. When the irradiance was elevated to  $8.9 \text{ KJ m}^{-2}$  the average germination was reduced to below 20% for 24 and 36 h of incubation.

The irradiation of *B. cinerea* conidia delayed the germination process. Since at lower doses, it was not possible to evaluate germination after 12 h of incubation (Table 2). The most appropriate incubation period for conidia germination evaluation was 24 h. After 36 h of incubation, it was difficult to count germination because the germinative tubes were long, intermingled, and not easily distinguishable.

The relative germination of eleven *B. cinerea* strains evaluated (LQC-162, LQC-150, LQC-159, LQC-157, LQC-156, LQC-161, LQC-151, LQC-163, LQC-158, LQC-160, and LQC-155) ranged from 90% to 70%, and did not significantly differed among them after irradiation of  $6.4 \text{ KJ m}^{-2}$  (Figure 2). For the two other strains (LQC-154 and LQC-153), the conidia germination was below to 20% at same conditions.

The *B. cinerea* strain LQC-150 sporulation in leaf disks of strawberry was significantly higher than the other strains (Figure 3). Based on its germination and sporulation ability under UV-B irradiation, the strain LQC 150 was selected for confrontation studies with the previously selected UV-B tolerant strain of the biological control agent *C. rosea*.

The conidia germination of *B. cinerea* LQC-150 showed a negative exponential response when submitted to irradiation ranging from 0 to 17.4 KJ m<sup>-2</sup> (Figure 4). The median lethal dose (LD<sub>50</sub>) was 6.2 KJ m<sup>-2</sup> and the lethal dose of 100% (LD<sub>100</sub>) was 12.52 KJ m<sup>-2</sup> (Figure 4).

### **Confrontation of *Clonostachys rosea* and *Botrytis cinerea* under UV-B radiation in strawberry leaf disks.**

The area under *C. rosea* incidence curve on leaf disks was slightly reduced by the increase of UV-B radiation dose (Table 3). The average reduction was approximately 10% at a dose of 2.9 KJ m<sup>-2</sup> and 25% at a dose of 8.9 KJ m<sup>-2</sup>, when compared to non-irradiated plates. Significant differences, however, were found only in the higher radiation doses (8.9 KJ m<sup>-2</sup>). When applied at 10<sup>6</sup> conidia mL<sup>-1</sup>, the negative effect was more accentuated. There were no differences on *C. rosea* incidence when applied alone or combined with *B. cinerea*.

The UV-B radiation had no significant effects on *B. cinerea* incidence when applied alone. When inoculated simultaneously with the biological control agent, the incidence of the pathogen was significantly reduced on non-irradiated plates (Table 3). However, when irradiated, the ability of *C. rosea* to suppress the pathogen was significantly reduced (Table 3). When *C. rosea* was applied at lower concentration (10<sup>6</sup> conidia mL<sup>-1</sup>) and irradiated, the incidence of the pathogen was statistically equal in the presence or absence of the biological control agent, independently of the irradiation dose. When applied at higher concentration (10<sup>7</sup> conidia mL<sup>-1</sup>), although there was a reduction on *B. cinerea* suppression, the incidence of the pathogen was not significantly different from non-irradiated control (Table 3, Figure 5A).

The sporulation pattern was, in general, similar as describe for incidence of *C. rosea* (Table 4). The average reduction on sporulation of the fungus, when compared with non-irradiated plates, ranged from 30% to 60% at irradiation doses of 2.9 KJ m<sup>-2</sup> and 8.9 KJ m<sup>-2</sup>, respectively, independently of the presence of the pathogen.

Similarly as observed for *B. cinerea* incidence, the pathogen sporulation was not affected by irradiation doses when applied alone. In the presence of *C. rosea*, the sporulation of the pathogen was significantly reduced on all treatments. Best results on pathogen suppression, however, were achieved when the biological control was applied at higher concentration (Table 4, Figure 5B).

## Discussion

The use of biocontrol agents that compete for space and nutrients is a well known strategy to suppress the saprophytic growth and sporulation of necrotrophic pathogens (Kohl et al., 1995; Morandi et al., 2003).

In Brazil, there are promising results of *C. rosea* suppressing gray mold in strawberry under field conditions (Cota et al., 2008a; Cota et al., 2008b). However, the efficacy of *C. rosea* against *B. cinerea* is directly related to the ability of the antagonist to colonize senescent tissues of the host faster than the pathogen (Morandi et al., 2000). *C. rosea* can colonize, without expression of symptoms, leaves of different species, including strawberry (Sutton et al., 1997). Once established on host tissues, the biocontrol agent is able to suppress the sporulation of the pathogen in crop residues (Morandi et al., 2003; Morandi et al., 2006).

Therefore, the climatic conditions during the time of application and subsequent hours are critical to the establishment of *C. rosea* (Sutton et al., 1997; Morandi et al., 2006). In order to achieve excellent levels of control is essential to implement management practices to preserve favorable conditions for the biological control agent, ensuring the viability of conidia and success of colonization. Weather conditions that affect the establishment of *C. rosea* on host tissues, such as humidity and temperature, are widely studied (Sutton et al., 1997; Yu and Sutton, 1998; Morandi et al., 2001).

However we suggest that other environmental conditions, such as ultraviolet radiation, must also be observed, since this factor is able to derail conidia of *C. rosea* within few hours of exposure (Morandi et al., 2008; Costa et al., 2012), and can reduce the antagonistic ability of the fungus (Costa et al., 2013).

Conidia of *B. cinerea* are more tolerant to UV-B radiation than conidia of the biocontrol agent. When comparing the most tolerant isolates of *C. rosea* and *B. cinerea*, conidia of the pathogen withstand up to 50% higher dosage of UV-B radiation (data not show). Our work corroborate the hypothesis raised by Ignoffo and Garcia (1992), that the

color of conidia was determinant in tolerance to solar radiation. *B. cinerea* black conidia have showed greater tolerance to UV-B radiation than the *C. rosea* hyaline conidia. This fact implies that *C. rosea* has a natural disadvantage against *B. cinerea* when exposed to solar radiation.

The exclusion of certain wavelengths including the ultraviolet radiation can reduce sporulation of some pathogens such as *B. cinerea* (Elad (1997)). For greenhouse crops, a mitigation measure would be to use plastic to filter ultraviolet radiation environment and thereby increase the viability of conidia of the biocontrol agent, also increasing its capacity for biological control against the pathogen. Costa et al. (2001) get to increase the viability of conidia of *B. bassiana* with the use of plastics that filtered the radiation in a wavelength below 320 nm.

The multiplication method (Moore et al., 1993; Rangel et al., 2004) and the use of additives in the formulation that increases the strength and/or reduces exposure of conidia to UV radiation (Reddy et al., 2008) can be used to overcome this limitation.

Considering that the competition is the most important mechanism of control of *C. rosea* against *B. cinerea* in strawberry, the applied concentration of the conidia of the biocontrol agent seems to have a crucial role on preserving the ability of the antagonist to colonize the leaf tissues and then suppress the pathogen sporulation, when exposed to an increase UV-B radiation. Formulation of *C. rosea* conidia in a UV-B protection matrix can be a feasible strategy to overcome the natural disadvantage of the antagonist in the field.

### **Acknowledgments**

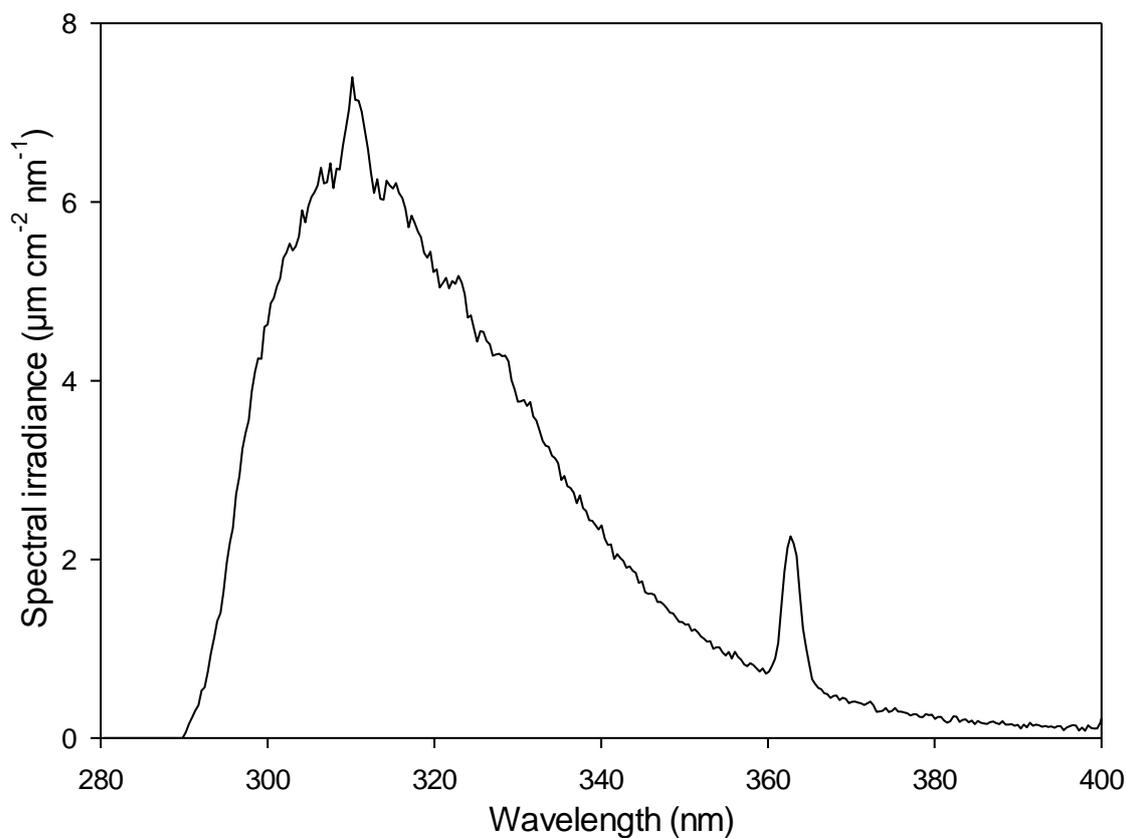
We thank the project “Impacts of climate change on plant diseases, pests, and weeds” (CLIMAPEST Embrapa). Lucio B. Costa and the senior author acknowledged by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq for the scholarship and productivity fellowship, respectively.

### **References**

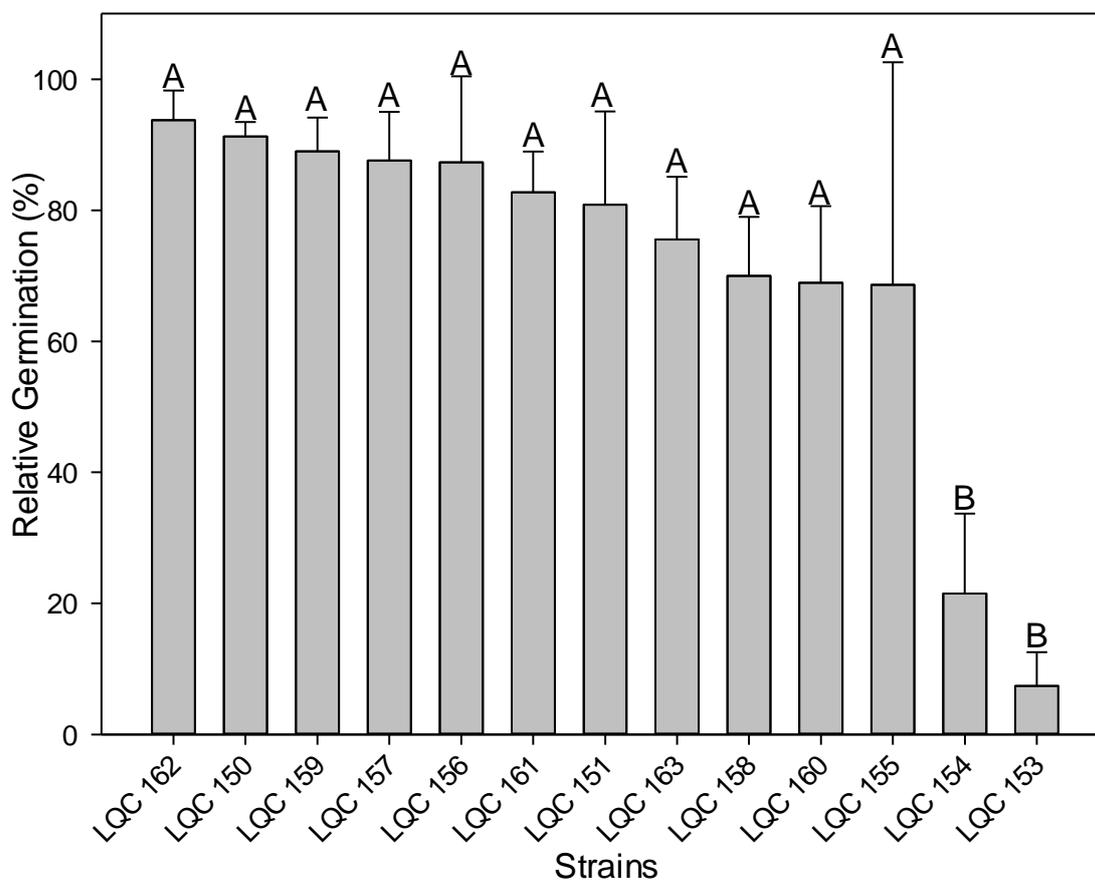
- Blanco, C., de los Santos, B., and Romero, F. (2006) Relationship between concentrations of *Botrytis cinerea* conidia in air, environmental conditions, and the incidence of grey mould in strawberry flowers and fruits. *European Journal of Plant Pathology* **114**: 415-425.
- Boff, P., Kohl, J., Jansen, M., Horsten, P., Lombaers-Van Der Plas, C., and Gerlagh, M. (2002) Biological control of gray mold with *Ulocladium atrum* in annual strawberry crops. *Plant Disease* **86**: 220-224.

- Braga, G.U.L., Flint, S.D., Messias, C.L., Anderson, A.J., and Roberts, D.W. (2001a) Effects of UVB irradiance on conidia and germinants of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*: A study of reciprocity and recovery. *Photochemistry and Photobiology* **73**: 140-146.
- Braga, G.U.L., Flint, S.D., Messias, C.L., Anderson, A.J., and Roberts, D.W. (2001b) Effect of UV-B on conidia and germlings of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research* **105**: 874-882.
- Card, S.D., Walter, M., Jaspers, M.V., Aztejnberg, A., and Stewart, A. (2009) Targeted selection of antagonistic microorganisms for control of *Botrytis cinerea* of strawberry in New Zealand. *Australasian Plant Pathology* **38**: 183 - 192.
- Costa, H.S., Robb, K.L., and Wilen, C.A. (2001) Increased persistence of *Beauveria bassiana* spore viability under high ultraviolet blocking greenhouse plastic. *Hortscience* **36**: 1082-1084.
- Costa, L.B., Rangel, D., Morandi, M.A.B., and Bettiol, W. (2012) Impact of UV-B radiation on *Clonostachys rosea* germination and growth. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **28**: 2497-2504.
- Costa, L.B., Rangel, D.E.N., Morandi, M.A.B., and Bettiol, W. (2013) Effects of UV-B radiation on the antagonistic ability of *Clonostachys rosea* to *Botrytis cinerea* on strawberry leaves. *Biological Control* **65**: 95-100.
- Cota, L.V., Maffia, L.A., Mizubuti, E.S., Macedo, P.E., and Antunes, R.F. (2008a) Biological control of strawberry grey mould by *Clonostachys rosea* under field conditions. *Phytopathology* **98**: S41-S42.
- Cota, L.V., Maffia, L.A., Mizubuti, E.S.G., Macedo, P.E.F., and Antunes, R.F. (2008b) Biological control of strawberry gray mold by *Clonostachys rosea* under field conditions. *Biological Control* **46**: 515-522.
- Elad, Y. (1997) Effect of filtration of solar light on the production of conidia by field isolates of *Botrytis cinerea* and on several diseases of greenhouse-grown vegetables. *Crop Protection* **16**: 635-642.
- Guetsky, R., Shtienberg, D., Elad, Y., and Dinoor, A. (2001) Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. *Phytopathology* **91**: 621-627.
- Ignoffo, C.M., and Garcia, C. (1992) Influence of conidial color on inactivation of several entomogenous fungi (Hyphomycetes) by simulated sunlight. *Environmental Entomology* **21**: 913-917.
- Jarvis, W.R. (1989) Managing diseases in greenhouse crops. *Plant Disease* **73**: 190-194.
- Kohl, J., Molhoek, W.M.L., Vanderplas, C.H., and Fokkema, N.J. (1995) *Effects of antagonists on sporulation of Botrytis cinerea on dead lily leaves under different field conditions*.
- Madronich, S., McKenzie, R.L., Bjorn, L.O., and Caldwell, M.M. (1998) Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* **46**: 5-19.
- Milner, R.J., Huppertz, R.J., and Swaris, S.C. (1991) A new method for assessment of germination of *Metarhizium* conidia. *Journal of Invertebrate Pathology* **57**: 121-123.
- Moore, D., Bridge, P.D., Higgins, P.M., Bateman, R.P., and Prior, C. (1993) Ultraviolet radiation damage to *Metarhizium flavoviride* conidia and the protection given by vegetable and mineral oils and chemical sunscreens. *Annals of Applied Biology* **122**: 605-616.
- Morandi, M.A.B., Sutton, J.C., and Maffia, L.A. (2000) Effects of host and microbial factors on development of *Clonostachys rosea* and control of *Botrytis cinerea* in rose. *European Journal of Plant Pathology* **106**: 439-448.

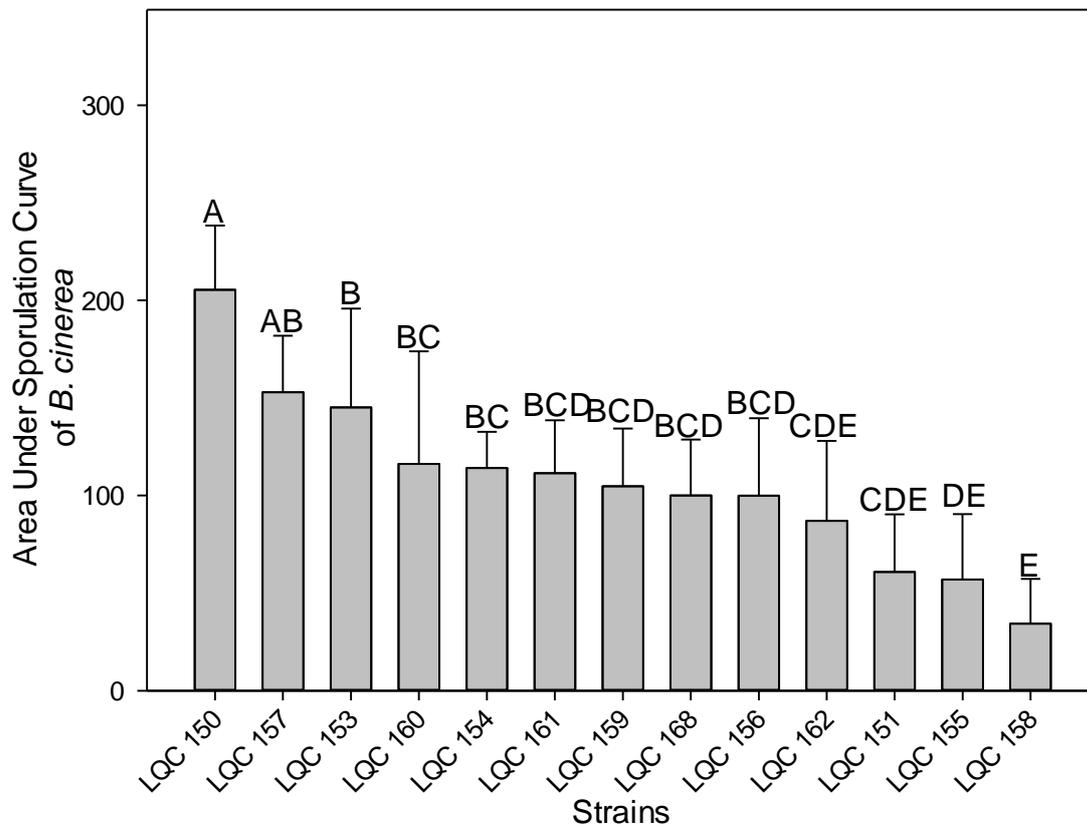
- Morandi, M.A.B., Maffia, L.A., and Sutton, J.C. (2001) Development of *Clonostachys rosea* and interactions with *Botrytis cinerea* in rose leaves and residues. *Phytoparasitica* **29**: 103-113.
- Morandi, M.A.B., Mattos, L.P.V., Santos, E.R., and Bonugli, R.C. (2008) Influence of application time on the establishment, survival, and ability of *Clonostachys rosea* to suppress *Botrytis cinerea* sporulation on rose debris. *Crop Protection* **27**: 77-83.
- Morandi, M.A.B., Maffia, L.A., Mizubuti, E.S.G., Alfenas, A.C., and Barbosa, J.G. (2003) Suppression of *Botrytis cinerea* sporulation by *Clonostachys rosea* on rose debris: a valuable component in *Botrytis* blight management in commercial greenhouses. *Biological Control* **26**: 311-317.
- Morandi, M.A.B., Maffia, L.A., Mizubuti, E.S.G., Alfenas, A.C., Barbosa, J.G., and Cruz, C.D. (2006) Relationships of microclimatic variables to colonization of rose debris by *Botrytis cinerea* and the biocontrol agent *Clonostachys rosea*. *Biocontrol Science and Technology* **16**: 619-630.
- Paul, N.D., Rasanayagam, S., Moody, S.A., Hatcher, P.E., and Ayres, P.G. (1997) The role of interactions between trophic levels in determining the effects of UV-B on terrestrial ecosystems. *Plant Ecology* **128**: 296-308.
- Peng, G., and Sutton, J.C. (1991) Evaluation of microorganisms for biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry. *Canadian Journal of Plant Pathology Revue Canadienne de Phytopathologie* **13**: 247-257.
- Quaite, F.E., Sutherland, B.M., and Sutherland, J.C. (1992) Action spectrum for DNA damage in alfalfa lowers predicted impact of ozone depletion. *Nature* **358**: 576-578.
- Rangel, D.E.N., Braga, G.U.L., Anderson, A.J., and Roberts, D.W. (2005) Influence of growth environment on tolerance to UV-B radiation, germination speed, and morphology of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* conidia. *Journal of Invertebrate Pathology* **90**: 55-58.
- Rangel, D.E.N., Braga, G.U.L., Flint, S.D., Anderson, A.J., and Roberts, D.W. (2004) Variations in UV-B tolerance and germination speed of *Metarhizium anisopliae* conidia produced on insects and artificial substrates. *Journal of Invertebrate Pathology* **87**: 77-83.
- Reddy, N.P., Khan, P.A.A., Devi, K.U., Victor, J.S., and Sharma, H.C. (2008) Assessment of the suitability of Tinopal as an enhancing adjuvant in formulations of the insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. *Pest Management Science* **64**: 909-915.
- Sutton, J.C., Li, D.W., Peng, G., Yu, H., Zhang, P.G., and Valdebenito-Sanhueza, R.M. (1997) *Gliocladium roseum* - A versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. *Plant Disease* **81**: 316-328.
- Swadling, I.R., and Jeffries, P. (1996) Isolation of microbial antagonists for biocontrol of grey mould disease of strawberries. *Biocontrol Science and Technology* **6**: 125-136.
- Tronsmo, A., and Dennis, C. (1977) Use of *Trichoderma* species to control strawberry fruits rots. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **83**: 449-455.
- Yu, H., and Sutton, J.C. (1998) Effects of inoculum density, wetness duration, and temperature on control of *Botrytis cinerea* by *Gliocladium roseum* in raspberry. *Canadian Journal of Plant Pathology Revue Canadienne de Phytopathologie* **20**: 243-252.



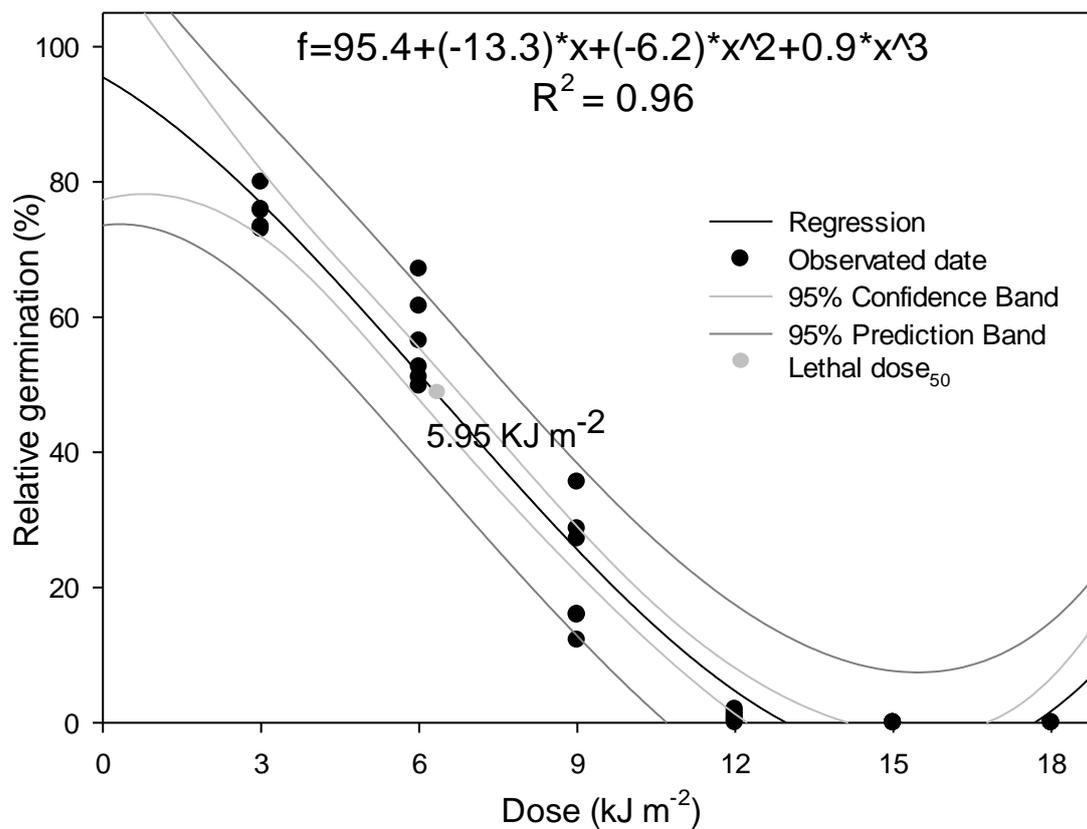
**Figure 1.** Spectral irradiances of the lamp setups used for the different UV treatments. Chamber providing UV-B irradiance of  $823 \text{ mW m}^{-2}$ , for the lamp heights of 18 centimeter from the sample second Quaita weighted. The chamber emitted dose of  $2.96 \text{ KJ m}^{-2}$  of UV-B radiation per hour. The lamps were covered with a 0.1-mm thick cellulose acetate, which blocked radiation below 290 nm.



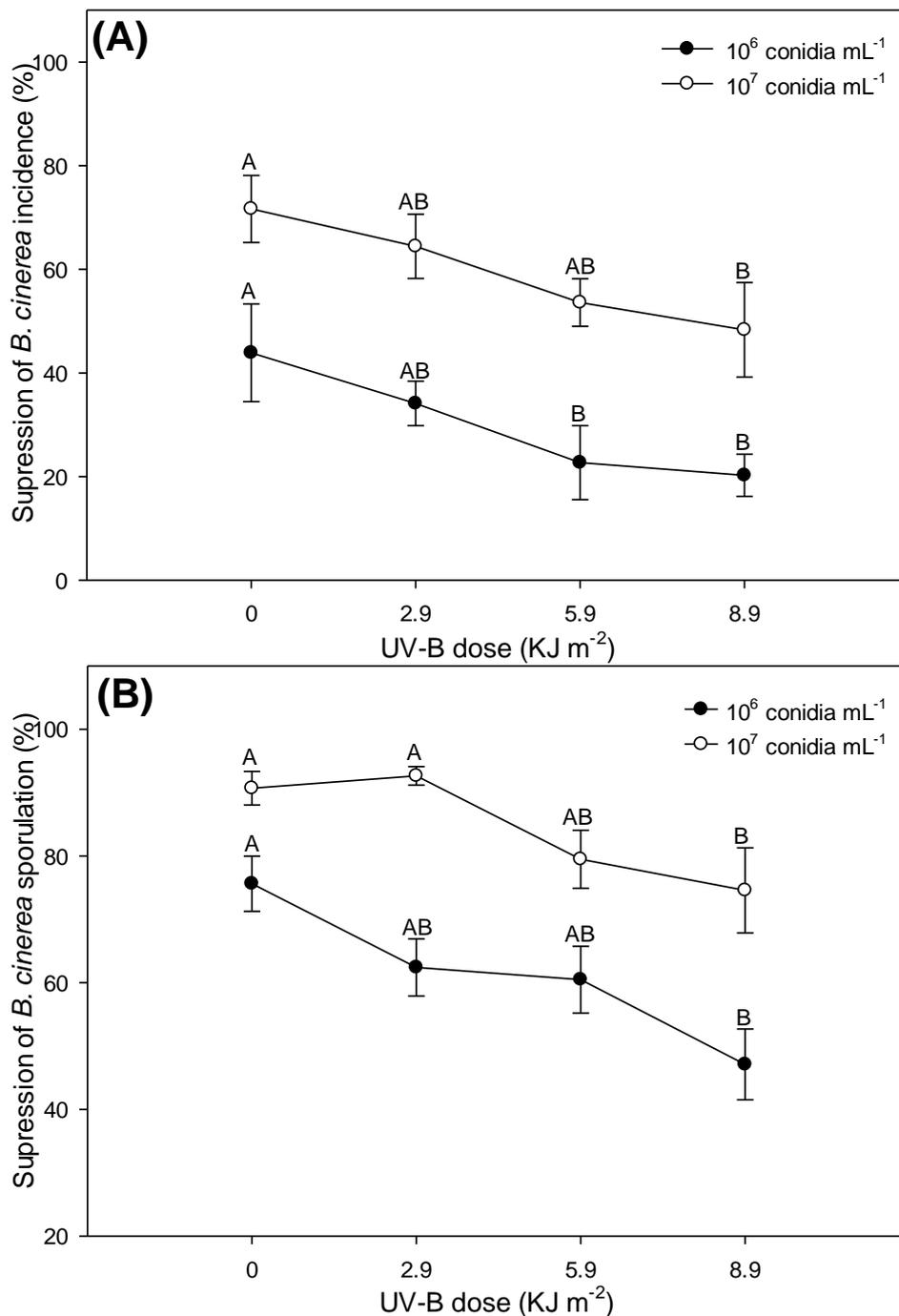
**Figure 2.** Relative germination of *Botrytis cinerea* conidia after exposure to  $6.4 \text{ KJ m}^{-2}$  of UV-B radiation (Quaite weighted irradiance of  $823 \text{ mW m}^{-2}$  at a different weighted dose). Relative germination was calculated in relation to control plates. Graph bars with the same letters are not significantly different by the Tukey test at 5% of significance ( $p < 0.001$ ). Errors bar are standard deviation of three independent experiments.



**Figure 3.** Area Under Sporulation Curve of *Botrytis cinerea* strains in leaf disks. Graph bars with the same letters are not significantly different by the Tukey test at 5 % of significance ( $p < 0.001$ ). Errors bar are standard deviation of three independent experiments.



**Figure 4.** Survival curve of *Botrytis cinerea* conidia exposed to UV-B radiation on agar medium (strain LQC 150) to different weighted doses of UV-B radiation (Quaite weighted irradiance of 823 mW m<sup>-2</sup> at a different weighted dose).



**Figure 5.** A) Biological control ability of *Clonostachys rosea* (LQC 62) against *Botrytis cinerea* (LQC 150) in strawberry leaf disks under UV-B radiation doses from 0 to 8.9 KJ m<sup>-2</sup> (Quaite weighted irradiance of 823 mW m<sup>-2</sup> at a different weighted dose). A) Suppression of *B. cinerea* incidence in leaf disks. *C. rosea* applied at 10<sup>7</sup> conidia mL<sup>-1</sup> (white circle) and at 10<sup>6</sup> conidia mL<sup>-1</sup> (black circle). B) Suppression of *B. cinerea* sporulation in leaf disks. *C. rosea* applied at 10<sup>7</sup> conidia mL<sup>-1</sup> (white circle) and at 10<sup>6</sup> conidia mL<sup>-1</sup> (black circle). Curves show mean values. Graph curves with the same letters are not significantly different by the Tukey test at 5 % of significance ( $p < 0.001$ ). Errors bar are standard deviation of three independent experiments.

**Table 1.** Strawberry *Botrytis cinerea* strains geographic origin and date of isolation.

Strain	Geographic origin	Date of isolation
150		
151		
152		
153		
153		
LQC 155	Serra Negra, São Paulo State, Brazil	March 10, 2011
156		
157		
158		
159		
160		
LQC 161	Atibaia, São Paulo State, Brazil	June 15, 2010
LQC 162	Jaguariúna, São Paulo State, Brazil	February 10, 2011

**Table 2.** Conidia germination of *Botrytis cinerea* strains exposed to different doses of UV-B radiation. Conidia were exposed for 2, 3 and 4 h to UV-B irradiation at a weighted doses of 0 (Control), 5.9, 8.9 and 11.9 KJ m<sup>-2</sup> (Irradiance of 823 mW m<sup>-2</sup>) and incubate for 12, 24 and 36h before evaluation Errors are standard deviation of three independent experiments.

Incubation (h)	UV-B radiation dose (KJ m <sup>-2</sup> )			
	0 (control)	5.9	8.9	11.9
12	97 ± 1.2	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
24	99 ± 0.7	70.4 ± 3	14 ± 6.14	0 ± 0
36	98.9 ± 0.6	79.6 ± 2.8	21.2 ± 6.8	0.5 ± 0.3

**Table 3.** Effects of UV-B radiation on incidence of *Clonostachys rosea* and *Botrytis cinerea*, applied alone or at the same time on leaf disk of strawberry. Means are Area Under Incidence Curve (AUI) of the fungus on leaf disks. *C. rosea* applied at  $10^7$  or  $10^6$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ ; *B. cinerea* applied at  $10^5$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ . The disks were exposed to UV-B irradiation at weighted doses of 0 to 8.9  $\text{KJ m}^{-2}$  (Irradiance of  $823 \text{ mW m}^{-2}$ ). Errors are standard deviation of three independent experiments.

AUI of:		UV-B radiation dose ( $\text{KJ m}^{-2}$ )			
		0	2.9	5.9	8.9
<i>C. rosea</i> ( $10^7$ con. $\text{mL}^{-1}$ )	Alone	290± 3 aA	260± 4 abA	242± 6 bcA	218±18cA
	+ <i>Bc</i>	290± 5 aA	260± 8 aA	253± 9 aA	185±21bA
<i>C. rosea</i> ( $10^6$ con. $\text{mL}^{-1}$ )	Alone	280± 5 aA	248±14 aA	242±16abA	195±18bA
	+ <i>Bc</i>	240±16aB	225±17abA	162±26bcB	145±20cA
<i>B. cinerea</i> ( $10^5$ con. $\text{mL}^{-1}$ )	Alone	300± 0 aA	275±10 aA	285± 8 aA	287± 7 aA
	+ <i>Cr</i> ( $10^6$ )	168±28aB	215±18abA	240±23abA	267± 7 bA
	+ <i>Cr</i> ( $10^7$ )	85 ±19aC	120±24 aB	152±18 aB	155±27aB

\* Small letter compare means in row for each combination and capital letters compare means in columns for each combination. Means follows by the same letter do not differ according Tukey test ( $p < 0.05$ ).

**Table 4.** Effects of UV-B radiation on sporulation of *Clonostachys rosea* and *Botrytis cinerea*, applied alone or at the same time on leaf disk of strawberry. Means are Area Under Sporulation Curve (AUSC) of the fungus on leaf disks. *C. rosea* applied at  $10^7$  or  $10^6$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ ; *B. cinerea* applied at  $10^5$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ . The disks were exposed to UV-B irradiation at weighted doses of 0 to 8.9  $\text{KJ m}^{-2}$  (Irradiance of  $823 \text{ mW m}^{-2}$ ). Errors are standard deviation of three independent experiments.

AUSC of:		UV-B radiation dose ( $\text{KJ m}^{-2}$ )			
		0	2.9	5.9	8.9
<i>C. rosea</i> ( $10^7$ con. $\text{mL}^{-1}$ )	Alone	36 $\pm$ 2aA*	24 $\pm$ 1 bA	20 $\pm$ 2 bAB	21 $\pm$ 3bA
	+ Bc	34 $\pm$ 2 aA	27 $\pm$ 3 abA	24 $\pm$ 2 abA	19 $\pm$ 4bA
<i>C. rosea</i> ( $10^6$ con. $\text{mL}^{-1}$ )	Alone	36 $\pm$ 3 aA	24 $\pm$ 3 bA	25 $\pm$ 2 bA	17 $\pm$ 2bA
	+ Bc	31 $\pm$ 3 aA	20 $\pm$ 2 bA	14 $\pm$ 2 bB	13 $\pm$ 3bA
<i>B. cinerea</i> ( $10^5$ con. $\text{mL}^{-1}$ )	Alone	134 $\pm$ 7 aA	117 $\pm$ 13 aA	113 $\pm$ 11 aA	142 $\pm$ 7aA
	+ Cr ( $10^6$ )	32 $\pm$ 6 aB	50 $\pm$ 6 abB	56 $\pm$ 7 abB	71 $\pm$ 7bB
	+ Cr ( $10^7$ )	12 $\pm$ 4abC	10 $\pm$ 2 aC	27 $\pm$ 6 abB	34 $\pm$ 9bC

\* Small Letter compare means in row for each combination and capital letters compare means in columns for each combination. Means follows by the same letter do not differ according Tukey test ( $p < 0.05$ ).

## **CAPÍTULO 2**

### **EFEITO DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA-B NO DESENVOLVIMENTO DE *Clonostachys rosea* EM CONDIÇÕES DE CAMPO E NO ANTAGONISMO A *Botrytis cinerea***

Esse artigo foi redigido de acordo com as normas da revista Biological Control.

## ARTIGO DE PESQUISA

Efeito da radiação ultravioleta-B no desenvolvimento de  
*Clonostachys rosea* em condições de campo e no  
antagonismo a *Botrytis cinerea*

Lúcio B. Costa<sup>1\*,2</sup>, Marcelo A.B. Morandi<sup>2</sup>, Wagner Bettiol<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), CEP 18.610-307 - Botucatu, SP, Brazil.

<sup>2</sup> Embrapa Environment, CP 69, 13820-000 Jaguariúna, SP, Brazil.

\*Autor para contato: Telefone: 55.19 3311-2662, Fax: 55.19 3311-2640. E-mail: [luciobertoldo@yahoo.com.br](mailto:luciobertoldo@yahoo.com.br)

## Resumo

O mofo cinzento, causado por *Botrytis cinerea* é uma importante doença na cultura do morangueiro no Brasil. *Clonostachys rosea*, aplicado sobre folhas e restos culturais, reduz a esporulação do patógeno e pode complementar outras medidas de controle para o manejo da doença a campo. Com a redução da camada de ozônio, houve um aumento da intensidade da radiação ultravioleta-B na superfície terrestre, podendo dificultar O estabelecimento de agentes de biocontrole no campo. Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos da radiação UV-B sobre um isolado de *C. rosea*, previamente selecionado, e avaliar se existe efeito da radiação UV-B na habilidade de controle biológico a *B. cinerea* em condições de campo. Para tanto, foram conduzidos dois experimentos de campo consistindo na aplicação de *C. rosea* em dois momentos distintos (manhã e tarde) em plantas de morangueiro cultivar Camarosa, em nove parcelas experimentais simulando três diferentes tratamentos com radiação UV-B: ambiente; aumentada e reduzida. Após a aplicação do agente de biocontrole, foram coletadas folhas das plantas em diferentes intervalos de tempo, para posterior teste de germinação e esporulação dos fungos e antagonismo em discos de folha. Não houve alteração na presença e esporulação de *C. rosea* independentemente do tratamento com radiação UV-B. No entanto, a presença e esporulação de *B. cinerea* foram aumentadas nas parcelas com tratamento de UV-B aumentado. Com isso, o aumento da radiação UV-B reduziu a habilidade de controle biológico de *C. rosea* em controlar *B. cinerea* em experimentos em condições de radiação UV-B alteradas.

**Palavra-chave:** Mudanças climáticas, esporulação de fungo, morango e mofo-cinzento.

## Abstract

Gray mold, caused by *Botrytis cinerea*, is an important disease in strawberry plants in Brazil. *Clonostachys rosea*, applied in leaves and crop residues, reduce the pathogen sporulation and can complement other control measures for the disease management field. With the ozone depletion, there was an increase in the intensity of UV-B radiation on Earth's surface, which may hinder the establishment of biocontrol agents in the field. The objective of the study was to evaluate the effects of UV-B radiation on an isolate of *C. rosea*, previously selected, and assess whether there is an effect of UV-B on the ability of

biological control against *B. cinerea* under field conditions. For this purpose, two field experiments consisting of *C. rosea* application at two different periods (morning and afternoon) in strawberry plants cultivar Camarosa in nine experimental plots simulating three different treatments with UV-B radiation were conducted: UV-B environment; UV-B increased and UV-B reduced. After application of the biocontrol agent, plant leaves were collected at different periods and were tested for germination and sporulation of fungi and antagonism against *B. cinerea* in leaf discs. There wasn't change in the presence and sporulation of *C. rosea* regardless of the treatment with UV-B radiation. However, the presence and sporulation of *B. cinerea* were increased in treatments UV-B increased. In consequence, UV-B increased reduced the efficacy of *C. rosea* against *B. cinerea* in experimental field with UV-B altered.

### **Introdução**

A radiação ultravioleta pode ser convencionalmente dividida de acordo com o tamanho do comprimento de onda: radiação UV-C (100-280 nm), a qual não apresenta risco para a Terra porque é absorvida por outros gases como o oxigênio (Madronich et al., 1998); radiação UV-B (280-315 nm), que é filtrada pela camada de ozônio e tem alta atividade biológica quando comparada com os outros tipos de radiação ultravioleta, e é preocupação, até mesmo, para a saúde humana; e radiação UV-A (315-400 nm), que não é absorvida pela a camada de ozônio e tem impacto direto na superfície terrestre, mas com pouca significância biológica (Madronich et al., 1998). A radiação solar é um dos fatores importantes a ser considerado na aplicação de um agente de controle biológico a campo (Braga et al., 2001a; Li e Feng, 2009; Morandi et al., 2006). As radiações UV-A e UV-B podem inativar propágulos de agentes de biocontrole em poucas horas, devido à alterações morfológicas e genéticas, resultando em perda de eficácia dos agente de biocontrole (Braga et al., 2001a).

O fungo *Clonostachys rosea* (sin. *Gliocladium roseum*: teleomorfo *Bionectria ochroleuca*; (Schroers et al., 1999) é comumente encontrado como saprófita de solo, com distribuição cosmopolita (Schroers, 2001; Sutton e Peng, 1993; Toledo et al., 2006). *Clonostachys rosea* é capaz de suprimir a esporulação de diversos patógenos de plantas, principalmente, por competição, além de apresentar características de endofítico, colonizando tecidos sadios sem causar doença nas plantas. Aplicações de *C. rosea* são mais eficientes quando realizada antes ou ao mesmo tempo em que o patógeno (Morandi et

al., 2003; Morandi et al., 2006; Sutton e Peng, 1993). Este fungo coloniza, sem expressão de sintomas, folhas de morango e framboesa (Sutton et al., 1997); raízes, caules, frutos e sementes de soja (Mueller e Sinclair, 1986). Em casa de vegetação, este bioagente suprimiu a infecção de *Botrytis cinerea* devido à competição por nutrientes e por tecido lesionado (Peng e Sutton, 1991; Sutton e Peng, 1993); e foi mais eficiente do que alguns fungicidas no controle desse patógeno em morangos cultivados em condições de campo no Brasil (Cota et al., 2008a; Cota et al., 2008b).

Os efeitos da radiação UV-B sobre os agentes de controle biológico foram estudados, principalmente, para *Metarhizium* spp., que é utilizado para o controle de pragas agrícolas (Braga et al., 2001b; Rangel et al., 2005). *Clonostachys rosea* é eficaz para o controle de *B. cinerea* em morangueiro, embora seja suscetível à radiação ultravioleta-B (Costa et al., 2012), tendo a sua habilidade de antagonismo ao patógeno reduzida em condições de aumento da radiação ultravioleta (Costa et al., 2013). Trabalhos de efeito da radiação ultravioleta sobre agentes de controle biológico, especialmente aqueles utilizados contra patógenos de plantas, como *C. rosea* são escassos (Costa et al., 2012; Costa et al., 2013; Morandi et al., 2008) e são inexistente estudos em condições de campo, envolvendo a interação da radiação UV-B × agentes de biocontrole × patógeno. Considerando o mercado desse agente de controle biológico promissor, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da radiação UV-B sobre um isolado de *C. rosea*, previamente selecionado, e avaliar se existe efeito da radiação UV-B na habilidade de controle biológico a *B. cinerea* em condições de campo.

## **Material e métodos**

### **Isolados e preparação do inóculo**

*Clonostachys rosea* (LQC 62) e *B. cinerea* (LQC 150) foram, previamente, selecionados como isolados tolerantes à radiação UV-B (Costa et al., 2012) e com boa capacidade de esporulação em discos de folhas. Estes isolados foram depositados na coleção de microrganismos da Embrapa Meio Ambiente. Os isolados foram cultivados em 20 mL de batata-dextrose-ágar (BDA - Acumedia Manufacturers, Michigan) em placas de Petri (poliestireno, 90 × 10 mm, Pleion) e incubados a  $25 \pm 2$  °C com 12 h luz/12 h escuro por 21 dias. Os conídios foram suspensos numa solução de Tween 80 em água destilada esterilizada (0,01% v/v), agitados vigorosamente utilizando um vortex e filtrados através de uma gaze para remover agregados de hifas. Concentrações dos conídios foram

estimadas pela contagem em hemacitômetro e as diluições foram realizadas com solução de Tween 80 estéril (0,01% v/v) para uso imediato em aplicações nas parcelas de morangueiro. A concentração utilizada no campo foi de  $10^7$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  para *C. rosea*, que foi aplicada com auxílio de um pulverizador costal (Jacto<sup>®</sup> model PJH), com bico tipo cone e de pressão de 75 psi. O volume de calda aplicado em cada parcela experimental variou de 0,4 a 0,5 L.

### **Experimentos de campo e tratamentos de irradiação**

Os experimentos foram realizados durante os meses de agosto e setembro de 2011. A área experimental estava localizada em Jaguariúna, Brasil (altitude de 584 m, latitude 22°42'20 "sul e longitude 46°59'09" leste). Foram instaladas nove parcelas experimentais de morango com 8,5 m<sup>2</sup> de área útil cada uma, com espaçamento entre plantas de 40 cm, num total de vinte e quatro plantas por parcela. Os canteiros foram cobertos com filme plástico preto (25  $\mu\text{m}$ - de espessura) e mudas da cultivar Camarosa transplantadas em 20/05/2011. Aos 20 dias após o plantio (dap), cada área foi adubada com 15 g NPK (4-14-8). As plantas foram irrigadas por gotejamento durante 90 min a cada dois dias. Para os tratamentos de radiação UV-B foram construídas nove estruturas metálicas (altura 2 m  $\times$  comprimento 3 m  $\times$  largura 2 m). A estrutura metálica foi instalada para fixar as lâmpadas de radiação UV-B e para cobrir as parcelas com diferentes tipos de plástico para alterar a radiação UV-B do ambiente. Todas as estruturas foram cobertas por plástico utilizado em casa de vegetação comercial, sem tratamento para retenção de radiação ultravioleta (100  $\mu\text{m}$  espessura) para homogeneizar a temperatura e proteger as plantas de eventos externos.

Os tratamentos com radiação UV-B foram: 1- UV-B ambiente: a estrutura foi coberta com um plástico de casa de vegetação sem tratamento ultravioleta (100  $\mu\text{m}$  espessura), que não bloqueava a radiação ultravioleta ambiente, este plástico cobriu todas as estruturas com a intenção de igualar as condições climáticas no interior das parcelas experimentais; 2- UV-B diminuído: esta estrutura contava com o plástico de casa de vegetação mais um filtro de poliéster (Metalgamica<sup>®</sup>, SP, Brasil) capaz de filtrar todos os espectros de radiação UV-B (<315 nm) fornecida pelo ambiente; 3- UV-B aumentado: a estrutura continha oito lâmpadas de radiação UV-B 313EL lamps (Q-lab Cleveland, OH, USA), que foram suspensas por meio de polias que permitiam alterar a distância das plantas. Cada lâmpada estava distanciada 30 cm sendo posicionadas a 40 cm do dossel das plantas de morangueiro. Para o controle das lâmpadas foi elaborado um sistema eletrônico

modular que controlava a intensidade das lâmpadas conforme as horas do dia (Tabela 1), com isso, tentou-se simular o aumento de radiação UV-B conforme as horas do dia. Cada lâmpada foi coberta com uma película de diacetato de celulose de 0,13 mm de espessura (Málaga Ltda), que retém comprimentos de ondas <290 nm. Isto permitia a passagem da maioria da radiação UV-B e UV-A (290–400 nm), mas impedia a exposição ao UV-C (>280 nm) e comprimentos da radiação UV-B que não incidem na superfície terrestre (>290 nm). Essas combinações estão próximas às descritas por Flint e Caldwell (2003).

A radiação UV-B proveniente das lâmpadas foi medida durante a noite para exclusão do efeito do ambiente e utilizou o espectro de ação ao DNA desenvolvida por Quate et al. (1992) e normalizados para a unidade em 300 nm sendo utilizada para calcular os níveis de irradiância de ultravioleta ( $\text{mW m}^{-2}$ ). Este espectro de ação foi selecionado com base nas características do trabalho desenvolvido por Paul et al. (1997). Todas as medições de radiação foram efetuadas com auxílio de um espectroradiômetro (Ocean Optics model USB2000 + rad) conectado a um computador portátil. Um sistema modular alterava automaticamente a potência das lâmpadas de acordo as horas do dia. O sistema ligava às 8:00 h e aumentava a potência em 25% a cada hora até 100% às 11:00 h, essa potência foi mantida até às 14:00 h. A partir desse horário, o sistema reduzia a potência em 25% a cada hora do dia até desligar as luzes às 17:00 h (Tabela 1). As médias das leituras realizadas são apresentadas na Figura 1.

*Clonostachys rosea* foi aplicado nos períodos da manhã e da tarde em dois experimentos independentes. **Aplicação no período da manhã:** no primeiro experimento *C. rosea* foi aplicado nos campos de morango às 8:00 h, como descrito anteriormente. Folhas de morango foram coletadas aleatoriamente (3, 5 e 9 h após a aplicação e diariamente pela manhã até o quinto dia, totalizando oito coletas). O material vegetal foi levado ao laboratório, onde foram extraídos 10 discos foliares de 1 cm de diâmetro e colocados no interior de placa de Petri, sendo avaliada a germinação, a esporulação e desafiado contra *B. cinerea*. **Aplicação no período da tarde:** no segundo experimento *C. rosea* foi aplicado sobre plantas, às 18:00 h. As folhas foram coletadas, de forma aleatória, após 0, 14, 15,5, 16,5, 17 e 21 h após a pulverização e todas as manhãs até o quinto dia, totalizando nove coletas. Foram realizadas as mesmas avaliações descritas anteriormente. Comparações foram realizadas entre as diferentes aplicações (manhã e tarde) e os possíveis efeitos causados pela variação da radiação UV-B entre *C. rosea* e *B. cinerea*.

Para o teste de germinação, os discos foliares foram incubados em câmara úmida durante 24 h pós a aplicação do bioagente, sendo em seguida colocados em lâminas de microscópio com lactofenol contendo 0,05% de azul de Tripán, suavemente aquecida em fogo por 2 min para limpar os tecidos e examinadas em um microscópio (Saha et al., 1988). A germinação foi avaliada através da contagem de 100 conídios por disco, em cinco lâminas por parcela para cada período de avaliação.

O teste de esporulação em discos foliares consistiu na transferência de 10 discos de folha por placa de Petri contendo meio de Paraquat-Clorofenicol-Ágar (PCA) (Peng e Sutton, 1991). A esporulação de *C. rosea* foi estimada após o tecido ser incubados a  $22 \pm 2$  °C (12 h de luz/12 h de escuro) sendo a esporulação quantificada no décimo dia. A avaliação foi realizada seguindo uma escala de notas para a área dos discos cobertos com conidióforos de *C. rosea*: 0 = 0% (0%); 1 = 2% (1–3%); 2 = 5% (4–6%); 3 = 10% (7–13%); 4 = 20% (14–27%); 5 = 40% (28–52%); 6 = 70% (53–87%) e 7 = 94% (88–100%) (Morandi et al., 2000). Para cada coleta foram montadas cinco placas por parcela. Todas as avaliações foram feitas com auxílio de um microscópio estereoscópico.

Nos estudos onde ocorreu o desafio por *B. cinerea*, em estudos em laboratório, metade dos discos tratados com *C. rosea* e expostos aos diferentes tratamentos com radiação UV-B, recebeu uma alíquota de *B. cinerea* ( $10 \mu\text{L}$ ,  $10^5$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ ). O crescimento e a esporulação do patógeno foram estimados após os tecidos serem incubados a  $22 \pm 2$  °C (12 h luz/12 h escuro) sendo a esporulação avaliada no décimo dia. Como controle foi aplicado *B. cinerea* em discos de folha sem a aplicação de *C. rosea*. As avaliações foram realizadas seguindo uma escala de notas para a região dos discos coberta com conidióforos de *B. cinerea*: 0 = 0% (0%), 1 = 2% (1–3%), 2 = 5% (4–6%), 3 = 10% (7–12%), 4 = 20% (13–26%), 5 = 40% (27–53%), 6 = 65% (54–76%) e 7 = 90% (77–100%) (Peng e Sutton, 1991).

### **Análise dos dados**

Cada experimento foi conduzido em blocos ao acaso com três repetições. Para cada parcela foram utilizadas três placas com *C. rosea* e três placas com *C. rosea* + *B. cinerea* em cada período de avaliação. Os dados das três repetições experimentais invariavelmente resultaram em efeitos do tratamento na mesma classe de significância; portanto, os dados foram agrupados para as análises. Cálculos estatísticos foram realizados através do pacote SAS (Institute Inc., Cary, NC). Os dados para a germinação de conídios e esporulação do

fungo foram transformados quando necessário e examinados através de análise de variância (ANOVA). A área abaixo da curva de progresso da presença (AACPP) e área abaixo da curva de progresso da esporulação (AACPE) foram calculadas para o crescimento de *C. rosea* e *B. cinerea* e os tratamentos foram comparados pelo teste de Tukey. Quando não houve interações significativas entre os fatores, os dados foram agrupados para melhor análise.

### Resultados

A presença de *C. rosea* mostrou-se  $\geq 90\%$  durante todo o período do ensaio, independentemente do tratamento com radiação UV-B (Figura 2A), quando o bioagente foi aplicado pela manhã. Inversamente, a presença de *B. cinerea* foi pequena nas primeiras horas após a aplicação, porém foi aumentando gradualmente com o aumento do período de exposição solar (flutuou entre 0 a 80% na presença de *B. cinerea* – Figura 2B). A esporulação de *C. rosea* foi semelhante durante todo o período do experimento, oscilou entre 30 a 10% da área do disco (Figura 2C). Por outro lado, a esporulação de *B. cinerea* variou entre 0 a 20% da área do disco, embora tenha apresentada uma ligeira tendência de aumento no final do ensaio (Figura 2D).

A área abaixo da curva de progresso da presença de *C. rosea* (AACPPCr) não diferiu entre os tratamentos com radiação UV-B (Figura 3A), mas quando avaliada a Área abaixo da curva de progresso da presença de *B. cinerea* (AACPPBc) houve um aumento da presença do patógeno no tratamento UV-B aumentado, quando comparado com outros tratamentos (Figura 3B), durante a aplicação do antagonista na parte da manhã. A área abaixo da curva de progresso da esporulação de *C. rosea* (AACPECr) foi menor no tratamento com UV-B aumentado quando comparada com outros tratamentos (Figura 3C). A área abaixo da curva de progresso da esporulação de *B. cinerea* (AACPEBc) apresentou uma redução na esporulação com o aumento da radiação ultravioleta, tendo o tratamento UV-B diminuído apresentado maior esporulação de *B. cinerea* (Figura 3D). A habilidade de controle biológico da presença de *B. cinerea* foi de 40% nas parcelas UV-B aumentadas, 55% para UV-B diminuída e 53% na UV-B ambiente, respectivamente, para a esporulação houve um controle de 56% nas parcelas UV-B aumentadas, 78% para UV-B diminuída e 64% na UV-B ambiente, respectivamente. Houve uma redução gradual da germinação com o aumento da exposição às condições ambientes, independentemente dos tratamentos de radiação UV-B aplicadas (Figura 4A), não havendo diferença significativa

entre os tratamentos UV.

A presença do fungo foi  $\geq 80\%$ , durante todo o período de avaliação, independente do tratamento UV-B, quando *C. rosea* foi aplicado no período da tarde (Figura 5A). A presença de *B. cinerea* aumentou gradativamente conforme as horas do dia atingindo 100% na avaliação 17:00 do dia 95 dap (Figura 5B). A esporulação de *C. rosea* ficou estável durante todo o período do experimento, oscilando entre 30 e 10% da superfície do disco com conidióforos do agente de biocontrole (Figura 5C). A esporulação de *B. cinerea* variou entre 10 e 40% da área do disco, atingindo um pico na avaliação 17:00 do dia 95 dap (Figura 5D). Para a AACPPCr não houve diferença significativa entre os tratamentos para a presença de *C. rosea* (Figura 6A), para a AACPPBc no tratamento UV-B ambiente houve uma redução da presença de *B. cinerea* em relação aos outros tratamentos (Figura 6B). Não foram observadas diferenças significativas na esporulação dos fungos (Figura 6CD) independente do tratamento de radiação UV-B aplicados. A habilidade de controle de *B. cinerea* foi de 32% nas parcelas UV-B aumentadas, 25% para UV-B diminuída e 39% na UV-B ambiente respectivamente. Para a esporulação houve uma redução de 15% nas parcelas UV-B aumentadas, 23% para UV-B diminuída e 24% na UV-B ambiente, respectivamente. Não foi observada diferença na germinação dos esporos entre os tratamentos com radiação UV-B, com a germinação oscilando de 65 a 75%.

Na comparação entre as aplicações (manhã ou tarde), o desenvolvimento de *C. rosea* não foi alterado. No entanto, com as aplicações à tarde houve um aumento significativo da presença e da esporulação de *B. cinerea* no campo (Tabela 2).

## Discussão

Os efeitos da radiação ultravioleta sobre microrganismos podem ser direto sobre os vários estádios de desenvolvimento do microrganismo, como a germinação dos esporos, extensão do tubo germinativo (Aylor e Sanogo, 1997; Paul et al., 1997), desenvolvimento das hifas (Fourtouni et al., 1998) e esporulação (Ensminger, 1993), ou indiretos por meio de alterações no metabolismo secundário, especialmente na produção de moléculas que absorvem o ultravioleta (Garcia et al., 1997; Liakoura et al., 1999; Wicklow et al., 1998)

Os efeitos deletérios da radiação ultravioleta sobre agente de controle biológico foi estudados para *Metarhizium* sp. e *Boveria* sp. por Braga et al. (2001b) e Rangel et al. (2005). Braga et al. (2001b) observaram redução do tamanho do tubo germinativo de

conídios *Metharizium* spp. expostos à radiação UV-A/UV-B interferindo no estabelecimento do fungo a campo.

As condições climáticas durante e após a aplicação de *C. rosea* no campo são cruciais para o seu sucesso e estabelecimento. Condições climáticas, como umidade e temperatura são amplamente estudadas por afetar fortemente o estabelecimento do fungo (Morandi et al., 2006; Sutton et al., 1997). Para melhorar a eficiência da dispersão são necessárias preservar as condições ótimas para o estabelecimento do agente de biocontrole a campo. No entanto, com os dados observados no presente estudo, sugerimos que a radiação ultravioleta deve ser considerada durante no momento da aplicação, uma vez que o ultravioleta foi capaz de inativar conídios de *C. rosea* dentro de poucas horas de exposição (Costa et al., 2012), reduzindo, por conseguinte a sua capacidade (Costa et al., 2013) e, provavelmente, reduzindo o controle de *B. cinerea*.

Alterações do método de multiplicação (Moore et al., 1993; Rangel et al., 2004) e aditivos utilizados na formulação do produto biológico podem aumentar a resistência e/ou reduzir a exposição de conídios à radiação UV (Reddy et al., 2008). A persistência de conídios de *Beauveria bassiana* sob um plástico comercial de estufa que bloqueou comprimentos de onda UV abaixo de 360 nm aumentou a sua persistência e eficiência, quando comparados com plásticos desenvolvidos para bloquear comprimentos de onda abaixo de 380 nm (Costa et al., 2001). Não foi possível visualizar esses efeitos no presente estudo, porque o tratamento UV-B diminuído não mostrou efeito benéfico na presença ou na esporulação de *C. rosea*. Elad (1997) verificou que a exclusão de certos comprimentos de onda, incluindo a radiação ultravioleta, reduziu a esporulação de alguns patógenos, como *B. cinerea*.

De acordo com nossos resultados, além de apresentar menor crescimento sob radiação UV-B aumentada, quando comparado com os outros tratamentos, conídios de *C. rosea* tinham menor capacidade antagônica em ambiente com radiação UV-B aumentado, resultado esse similar ao obtido por Costa et al. (2013) em laboratório. São necessários estudos adicionais para observar a tolerância de conídios de *B. cinerea* à radiação UV-B e, assim, investigar se em ambientes com radiação UV-B aumentado pode haver favorecimento para o patógeno, reduzindo assim a capacidade de *C. rosea* em controlar *B. cinerea*.

## Agradecimentos

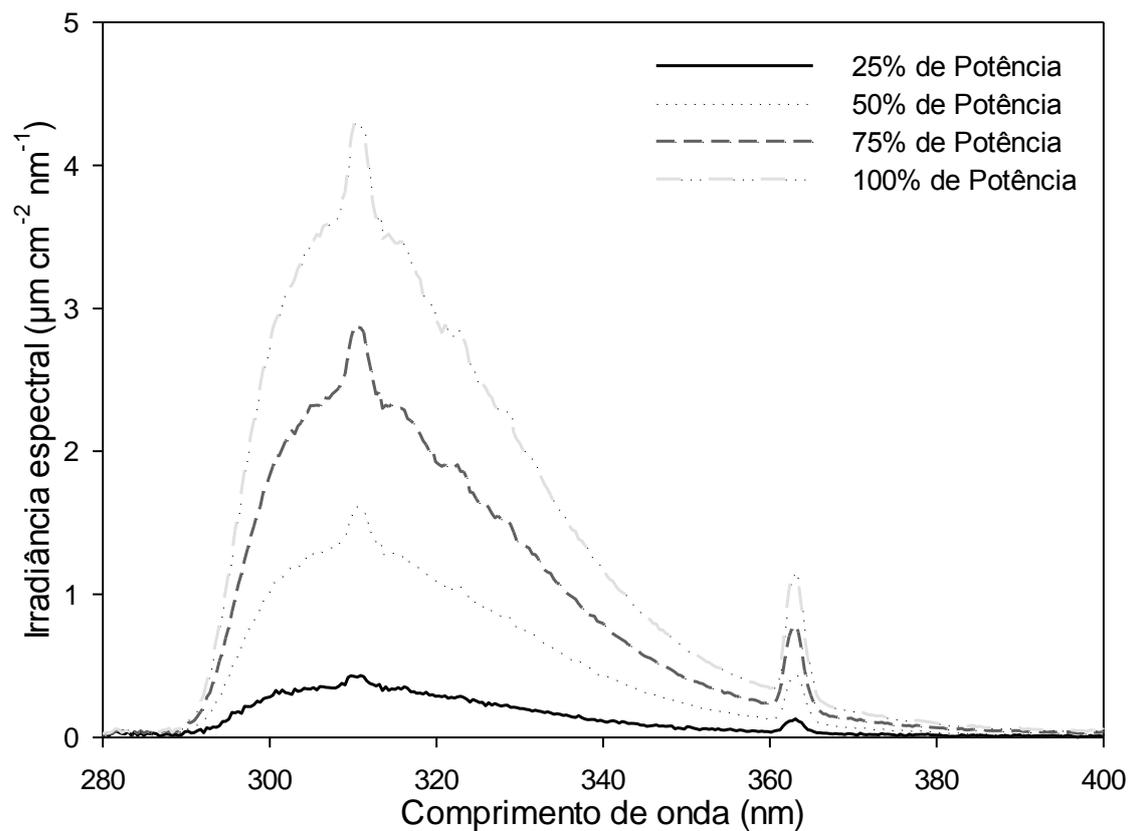
Este artigo faz parte da tese do primeiro autor que foi suportado por uma bolsa de estudos do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Também gostaria de agradecer ao CNPq pela bolsa de produtividade concedida para Wagner Bettiol.

## Referências bibliográficas

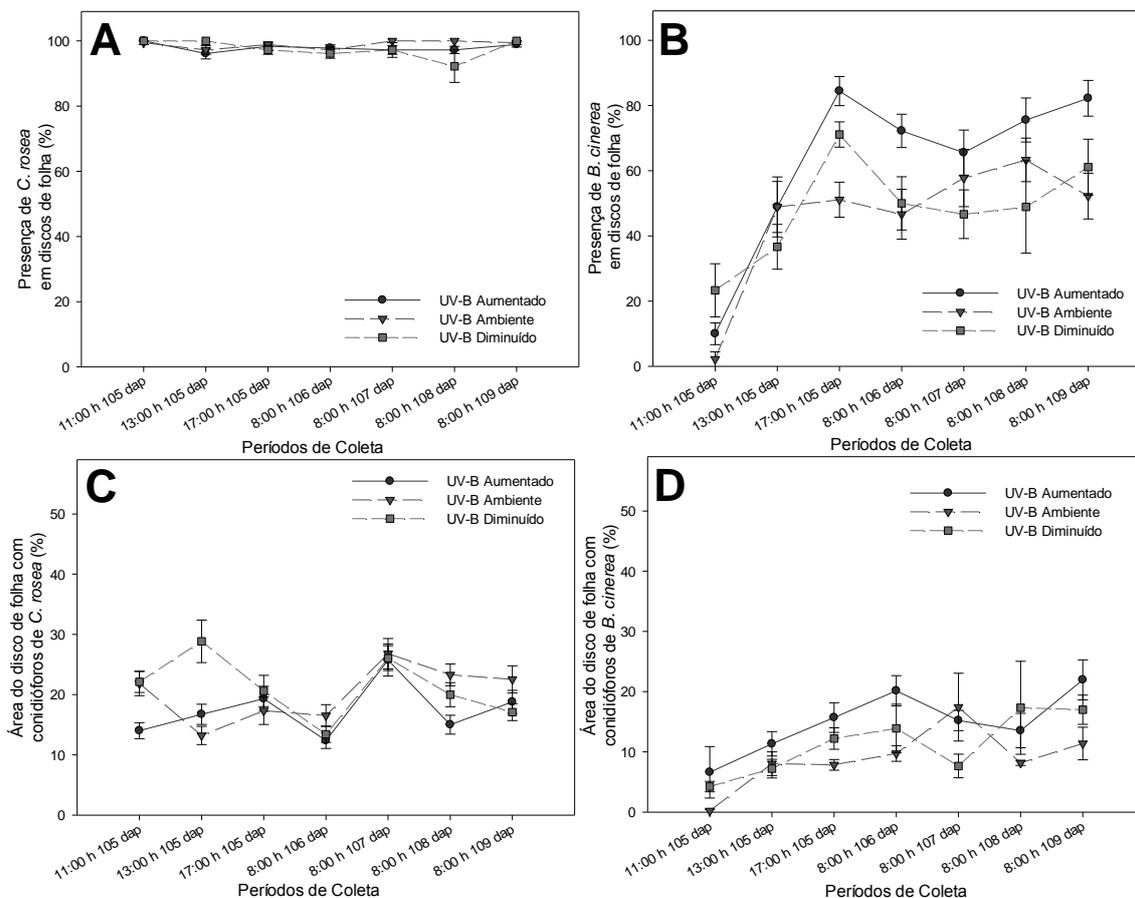
- Aylor, D.E., Sanogo, S., 1997. Germinability of *Venturia inaequalis* conidia exposed to sunlight. *Phytopathology* 87, 628-633.
- Braga, G.U.L., Flint, S.D., Messias, C.L., Anderson, A.J., Roberts, D.W., 2001a. Effect of UV-B on conidia and germlings of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research* 105, 874-882.
- Braga, G.U.L., Flint, S.D., Messias, C.L., Anderson, A.J., Roberts, D.W., 2001b. Effects of UV-B irradiance on conidia and germinants of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*: a study of reciprocity and recovery. *Photochemistry and Photobiology* 73, 140-146.
- Costa, H.S., Robb, K.L., Wilen, C.A., 2001. Increased persistence of *Beauveria bassiana* spore viability under high ultraviolet blocking greenhouse plastic. *Hortscience* 36, 1082-1084.
- Costa, L.B., Rangel, D.E.N., Morandi, M.A.B., Bettiol, W., 2012. Impact of UV-B radiation on *Clonostachys rosea* germination and growth. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28, 2497-2504.
- Costa, L.B., Rangel, D.E.N., Morandi, M.A.B., Bettiol, W., 2013. Effects of UV-B radiation on the antagonistic ability of *Clonostachys rosea* to *Botrytis cinerea* on strawberry leaves. *Biological Control* 65, 95-100.
- Cota, L.V., Maffia, L.A., Mizubuti, E.S.G., Macedo, P.E., Antunes, R.F., 2008a. Biological control of strawberry grey mould by *Clonostachys rosea* under field conditions. *Phytopathology* 98, S41-S42.
- Cota, L.V., Maffia, L.A., Mizubuti, E.S.G., 2008b. Brazilian isolates of *Clonostachys rosea*: colonization under different temperature and moisture conditions and temporal dynamics on strawberry leaves. *Letters in Applied Microbiology* 46, 312-317.
- Elad, Y., 1997. Effect of filtration of solar light on the production of conidia by field isolates of *Botrytis cinerea* and on several diseases of greenhouse grown vegetables. *Crop Protection* 16, 635-642.
- Ensminger, P.A., 1993. Control of development in plants and fungi by far UV radiation. *Physiologia Plantarum* 88, 501-508.
- Flint, S.D., Caldwell, M.M., 2003. A biological spectral weighting function for ozone depletion research with higher plants. *Physiologia Plantarum* 117, 137-144.
- Fourtouni, A., Manetas, Y., Christias, C., 1998. Effects of UV-B radiation on growth, pigmentation, and spore production in the phytopathogenic fungus *Alternaria solani*. *Canadian Journal of Botany* 76, 2093-2099.
- Garcia, S., Garcia, C., Heinzen, H., Moyna, P., 1997. Chemical basis of the resistance of barley seeds to pathogenic fungi. *Phytochemistry* 44, 415-418.
- Godin-Beekmann, S., 2010. Spatial observation of the ozone layer. *Comptes Rendus Geoscience* 342, 339-348.

- Li, J., Feng, M.G., 2009. Intraspecific tolerance of *Metarhizium anisopliae* conidia to the upper thermal limits of summer with a description of a quantitative assay system. *Mycological Research* 113, 93-99.
- Liakoura, V., Stavrianakou, S., Liakopoulos, G., Karabourniotis, G., Manetas, Y., 1999. Effects of UV-B radiation on *Olea europaea*: comparisons between a greenhouse and a field experiment. *Tree Physiology* 19, 905-908.
- Madronich, S., McKenzie, R.L., Bjorn, L.O., Caldwell, M.M., 1998. Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *Journal of Photochemistry and Photobiology B Biology* 46, 5-19.
- Moore, D., Bridge, P.D., Higgins, P.M., Bateman, R.P., Prior, C., 1993. Ultraviolet radiation damage to *Metarhizium flavoviride* conidia and the protection given by vegetable and mineral oils and chemical sunscreens. *Annals of Applied Biology* 122, 605-616.
- Morandi, M.A.B., Maffia, L.A., Mizubuti, E.S.G., Alfenas, A.C., Barbosa, J.G., 2003. Suppression of *Botrytis cinerea* sporulation by *Clonostachys rosea* on rose debris: a valuable component in *Botrytis* blight management in commercial greenhouses. *Biological Control* 26, 311-317.
- Morandi, M.A.B., Maffia, L.A., Mizubuti, E.S.G., Alfenas, A.C., Barbosa, J.G., Cruz, C.D., 2006. Relationships of microclimatic variables to colonization of rose debris by *Botrytis cinerea* and the biocontrol agent *Clonostachys rosea*. *Biocontrol Science and Technology* 16, 619-630.
- Morandi, M.A.B., Mattos, L.P.V., Santos, E.R., Bonugli, R.C., 2008. Influence of application time on the establishment, survival, and ability of *Clonostachys rosea* to suppress *Botrytis cinerea* sporulation on rose debris. *Crop Protection* 27, 77-83.
- Morandi, M.A.B., Sutton, J.C., Maffia, L.A., 2000. Effects of host and microbial factors on development of *Clonostachys rosea* and control of *Botrytis cinerea* in rose. *European Journal of Plant Pathology* 106, 439-448.
- Mueller, J.D., Sinclair, J.B., 1986. Occurrence and role of *Gliocladium roseum* in field grown soybeans in Illinois. *Transactions of the British Mycological Society* 86, 677-680.
- Paul, N.D., Rasanayagam, S., Moody, S.A., Hatcher, P.E., Ayres, P.G., 1997. The role of interactions between trophic levels in determining the effects of UV-B on terrestrial ecosystems. *Plant Ecology* 128, 296-308.
- Peng, G., Sutton, J.C., 1991. Evaluation of microorganisms for biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry. *Canadian Journal of Plant Pathology* 13, 247-257.
- Quaite, F.E., Sutherland, B.M., Sutherland, J.C., 1992. Action spectrum for DNA damage in alfalfa lowers predicted impact of ozone depletion. *Nature* 358, 576-578.
- Rangel, D.E.N., Braga, G.U.L., Anderson, A.J., Roberts, D.W., 2005. Influence of growth environment on tolerance to UV-B radiation, germination speed, and morphology of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* conidia. *Journal of Invertebrate Pathology* 90, 55-58.
- Rangel, D.E.N., Braga, G.U.L., Flint, S.D., Anderson, A.J., Roberts, D.W., 2004. Variations in UV-B tolerance and germination speed of *Metarhizium anisopliae* conidia produced on insects and artificial substrates. *Journal of Invertebrate Pathology* 87, 77-83.
- Reddy, N.P., Khan, P.A.A., Devi, K.U., Victor, J.S., Sharma, H.C., 2008. Assessment of the suitability of Tinopal as an enhancing adjuvant in formulations of the insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. *Pest Management Science* 64, 909-915.

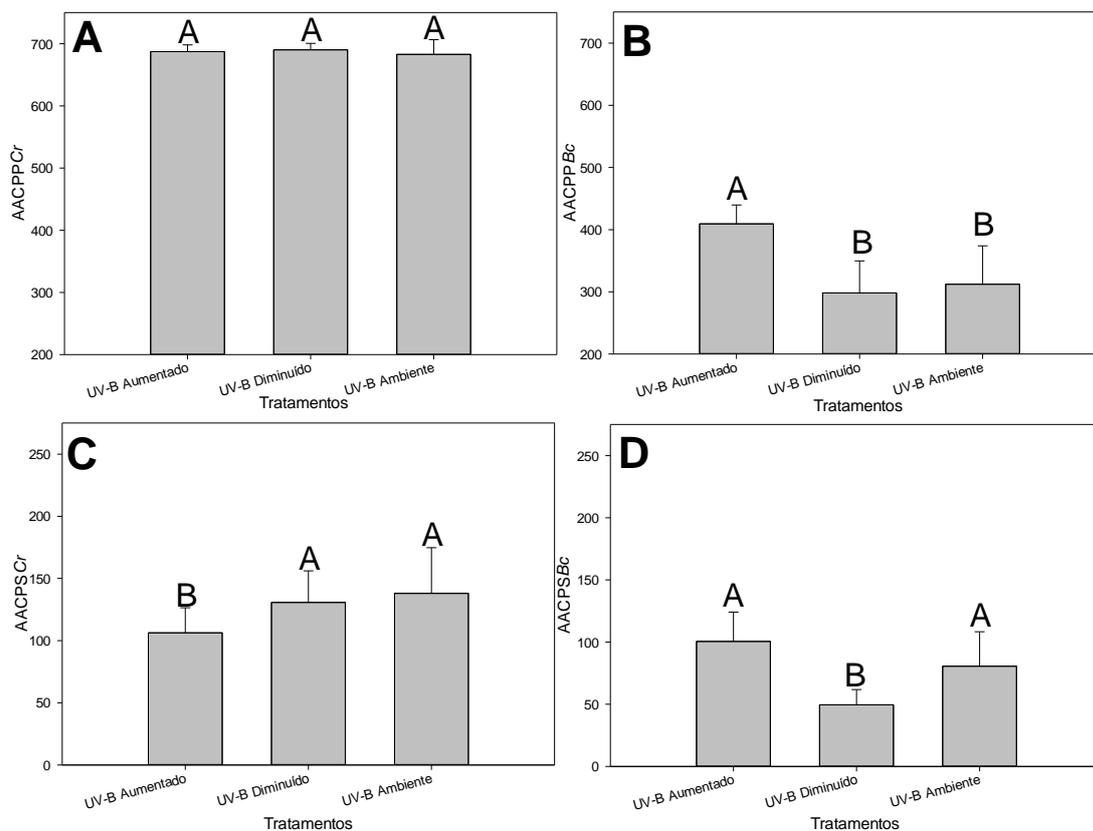
- Saha, D.C., Jackson, M.A., Johnsoncicalese, J.M., 1988. A rapid staining method for detection of endophytic fungi in turf and forage grasses. *Phytopathology* 78, 237-239.
- Schroers, H.J., 2001. A monograph of *Bionectria* (Ascomycota, Hypocreales, Bionectriaceae) and its *Clonostachys* anamorphs. *Studies in Mycology*, 1-214.
- Schroers, H.J., Samuels, G.J., Seifert, K.A., Gams, W., 1999. Classification of the mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys* as *C. rosea*, its relationship to *Bionectria ochroleuca*, and notes on other *Gliocladium*-like fungi. *Mycologia* 91, 365-385.
- Sutton, J.C., Li, D.W., Peng, G., Yu, H., Zhang, P.G., Valdebenito Sanhueza, R.M., 1997. *Gliocladium roseum* - A versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. *Plant Disease* 81, 316-328.
- Sutton, J.C., Peng, G., 1993. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry leaves. *Phytopathology* 83, 615-621.
- Toledo, A.V., Virla, E., Humber, R.A., Paradell, S.L., Lastra, C.C.L., 2006. 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* 92, 7-10.
- Wicklowsky, D.T., Norton, R.A., McAlpin, C.E., 1998. beta-Carotene inhibition of aflatoxin biosynthesis among *Aspergillus flavus* genotypes from Illinois corn. *Mycoscience* 39, 167-172.



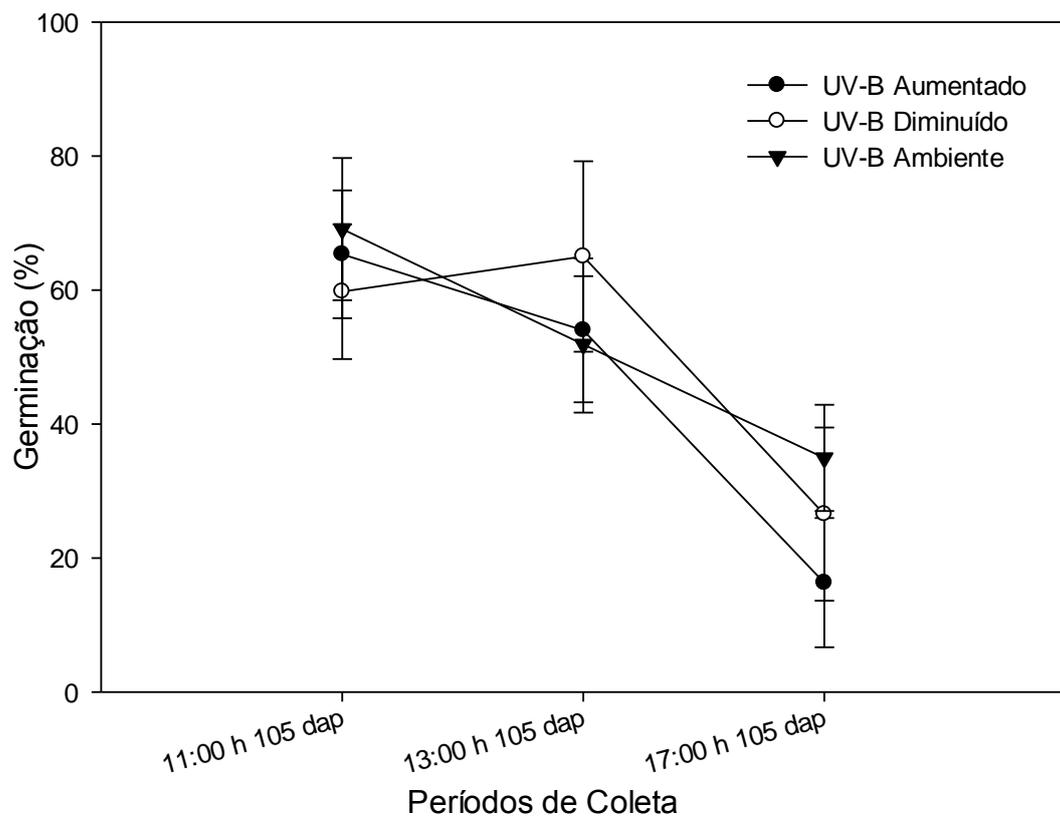
**Figura 1.** Irradiância espectral aferida no tratamento do campo utilizando diferentes potências das lâmpadas. Câmara de campo provinha potência de radiação UV-B de 25%, 50%, 75% e 100% conforme as horas do dia, que significam 43, 211, 343 e 443  $\text{mW m}^{-2}$  (segundo Quate), a altura utilizada foi de 40 cm de distância entre lâmpada e plantas. Cada lâmpada foi coberta com um filtro de acetato de celulose de 0,1 mm de espessura, que bloqueava radiações com comprimento de onda inferior a 290 nm.



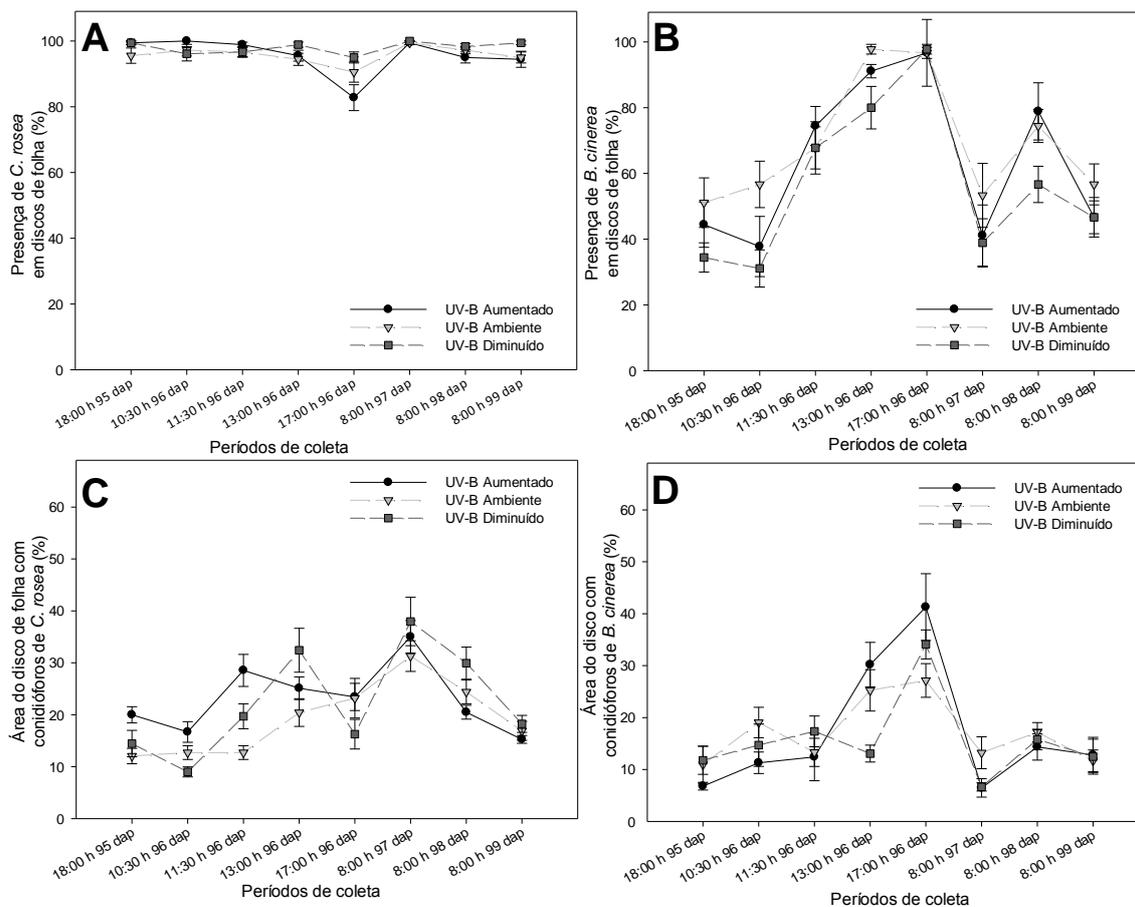
**Figura 2.** Aplicação do período da manhã a 105 dias após plantio (dap) (data 12/9/2011). Desenvolvimento de *Clonostachys rosea* e *Botrytis cinerea* em discos de folha de morangueiro entre diversos períodos de coleta. A) Presença de *C. rosea*. B) Presença de *B. cinerea*. C) Área dos discos de folha cobertos com conidióforos de *C. rosea*. D) Área dos discos de folha cobertos com conidióforos de *B. cinerea*. Todos os discos de folha foram colocados em placas de Petri contendo o meio Paraquat-Clonorofenicol-Ágar (PCA) para avaliação da esporulação dos fungos nos discos de folha.



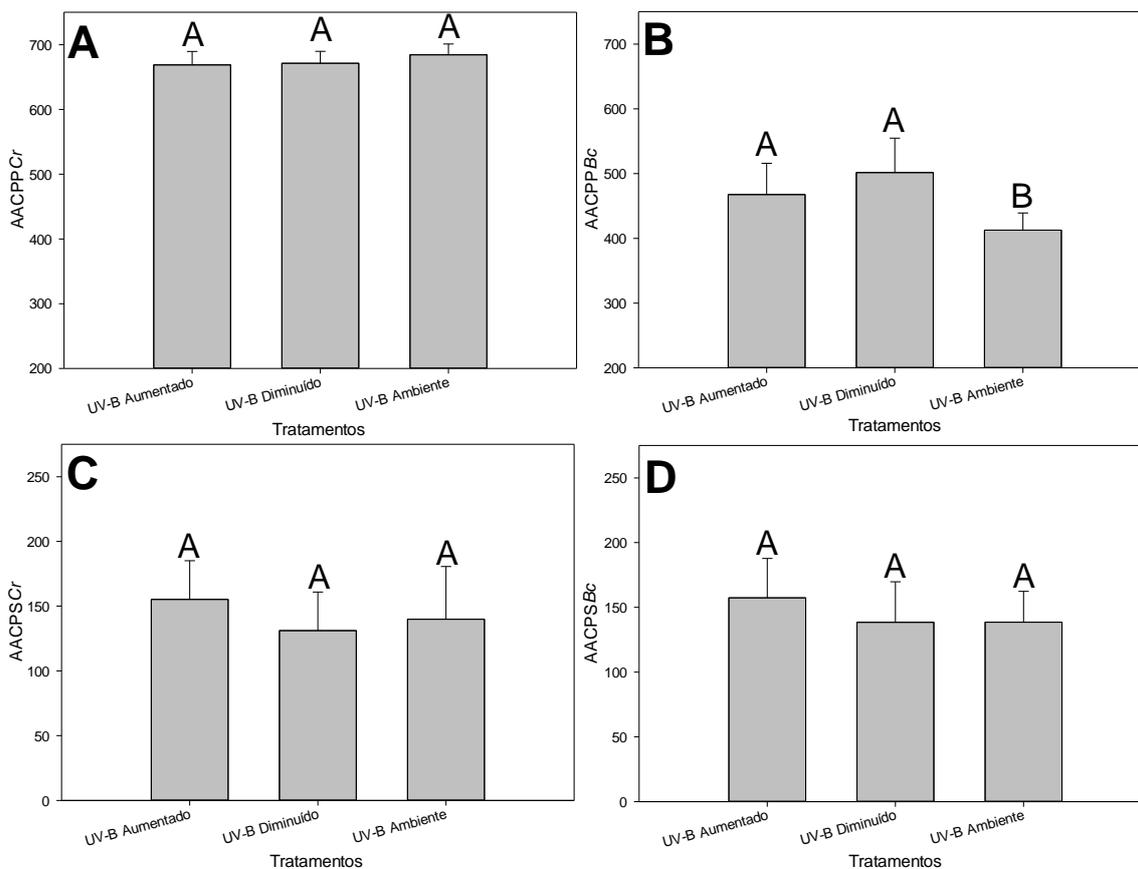
**Figura 3.** Área abaixo da curva de progresso dos fungos em diferentes tratamentos de radiação UV-B com o antagonista aplicado no período da manhã. A) Área abaixo da curva de progresso da presença de *C. rosea* (AACPPCr). B) Área abaixo da curva de progresso da presença de *B. cinerea* (AACPPBc). C) Área abaixo da curva de progresso da esporulação de *C. rosea* (AACPSCr). D) Área abaixo da curva de progresso da esporulação de *B. cinerea* (AACPSBc). Médias com a mesma letra não diferem entre si segundo o teste de Tukey a 5% de significância ( $p < 0,001$ ). Barra de erro é o desvio padrão de três repetições independentes.



**Figura 4.** Teste de germinação de conídios de *Clonostachys rosea* aplicado durante o período da manhã em diferentes tratamentos com radiação UV-B em três intervalos de tempo. Germinação dos conídios às 11:00, 13:00 e 17:00 h do dia 105 dias após o plantio (12/09/2011). Barra de erro é o desvio padrão de três repetições independentes.



**Figura 5.** Aplicação do período da manhã há 95 dias após plantio (dap) (data 29/8/2011). Desenvolvimento de *Clonostachys rosea* e *Botrytis cinerea* em discos de folha de morangueiro entre diversos períodos de coleta. A) Presença de *C. rosea*. B) Presença de *B. cinerea*. C) Área dos discos de folha cobertos com conidióforos de *C. rosea*. D) Área dos discos de folha cobertos com conidióforos de *B. cinerea*. Todos os discos de folha foram colocados em placas de Petri contendo o meio Paraquat-Clonorofenicol-Ágar (PCA) para avaliação da esporulação dos fungos nos discos de folha



**Figura 6.** Área abaixo da curva de progresso dos fungos em diferentes tratamentos de radiação UV-B com o antagonista aplicado no período da tarde. A) Área abaixo da curva de progresso da presença de *C. rosea* (AACPPCr). B) Área abaixo da curva de progresso da presença de *B. cinerea* (AACPPBc). C) Área abaixo da curva de progresso da esporulação de *C. rosea* (AACPSCr). D) Área abaixo da curva de progresso da esporulação de *B. cinerea* (AACPSBc). Médias com a mesma letra não diferem entre si segundo o teste de Tukey a 5% de significância ( $p < 0,001$ ). Barra de erro é o desvio padrão de três repetições independentes.

**Tabela 1.** Sistema eletrônico de funcionamento das lâmpadas, que mudava a potência conforme as horas do dia. Médias da irradiação seguindo o método de Quaitte et al., (1992).

Potência das lâmpadas	Horas do dia	Média da irradiação
25%	08:00 a 09:00	43 mW m <sup>-2</sup>
50%	09:00 a 10:00	211 mW m <sup>-2</sup>
75%	10:00 a 11:00	343 mW m <sup>-2</sup>
100%	11:00 a 14:00	443 mW m <sup>-2</sup>
75%	14:00 a 15:00	343 mW m <sup>-2</sup>
50%	15:00 a 16:00	211 mW m <sup>-2</sup>
25%	16:00 a 17:00	43 mW m <sup>-2</sup>

**Tabela 2.** Comparação do desenvolvimento de *Clonostachys rosea* e *Botrytis cinerea* em discos de folha entre os diferentes intervalos de aplicação (Manhã e Tarde) nos diferentes tratamentos de radiação UV-B.

		Área abaixo da curva de progresso da presença de <i>Clonostachys rosea</i>				Área abaixo da curva de progresso da esporulação de <i>Clonostachys rosea</i>			
UV-B Aumentado	Manhã	687	±	10	a	106	±	20	b
	Tarde	668	±	20	b	155	±	29	a
UV-B Diminuído	Manhã	690	±	10	a	130	±	25	a
	Tarde	671	±	18	b	131	±	29	a
UV-B Ambiente	Manhã	682	±	23	a	138	±	36	a
	Tarde	684	±	16	a	139	±	40	a
		Área abaixo da curva de progresso da presença de <i>Botrytis cinerea</i>				Área abaixo da curva de progresso da esporulação de <i>Botrytis cinerea</i>			
UV-B Aumentado	Manhã	409	±	30	b	100	±	23	b
	Tarde	467	±	48	a	157	±	30	a
UV-B Diminuído	Manhã	298	±	51	b	49	±	12	b
	Tarde	501	±	53	a	138	±	24	a
UV-B Ambiente	Manhã	412	±	26	a	80	±	27	b
	Tarde	312	±	61	b	138	±	24	a

\* Letras minúsculas comparam as médias em linha para cada combinação. Médias com a mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0.05$ ).

### **CAPÍTULO 3**

## **CONTROLE DE *Botrytis cinerea* EM *Nicotiana benthamiana* COM ÁCIDO PARA-AMINOBENZÓICO (PABA)**

Esse artigo foi redigido de acordo com as normas da revista Tropical Plant Pathology.

## ARTIGO DE PESQUISA

Controle de *Botrytis cinerea* em *Nicotiana benthamiana*  
com ácido para-aminobenzóico (PABA)

Lúcio B. Costa<sup>1\*</sup>, Paul H. Goodwin<sup>2</sup>, Wagner Bettiol<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) câmpus Botucatu, CEP 18.610-307 - Botucatu, SP, Brazil.

<sup>2</sup> School of Environmental Sciences, University of Guelph, Guelph, Ontario N1G2W1, Canada.

<sup>3</sup> Embrapa Meio Ambiente, CP 69, 13820-000 Jaguariúna, SP, Brazil.

\*Autor para correspondência: Telefone: 55.19 3311-2662, Fax: 55.19 3311-2740, e-mail: [luciobertoldo@yahoo.com.br](mailto:luciobertoldo@yahoo.com.br)

24/09/2014

### Resumo

O uso de vitaminas incluindo as vitaminas B1, B2 e K3 para a indução de resistência adquirida (SAR) para proteção de plantas contra fitopatógenos foi avaliado previamente. O uso de vitaminas é benéfico porque o mesmo é rentável e seguro ao meio ambiente. Neste estudo, o ácido para-aminobenzóico (PABA) foi selecionado devido ao seu efeito sobre a indução de SAR em plantas de *Nicotiana benthamiana* contra *Botrytis cinerea*. Foi realizado a aplicações semanais de PABA via solo (18 mmol/L) durante um mês e subsequentemente o patógeno foi inoculado nas folhas do hospedeiro. Foram analisados padrões de crescimento das plantas e desenvolvimento de sintomas do patógeno, sendo posteriormente avaliada a expressão de genes de defesa tais como: basic *NbPR-2*, *NbPR-1a*, *NbPR-14*, *Nb-AMCM*, *Nb-CHn* e *Nb-ACC* via técnica de RT-PCR. Foi possível avaliar que não houve redução de crescimento de plantas tratadas com PABA em comparação com o tratamento Controle, plantas tratadas com PABA apresentaram redução da lesão causada por *B. cinerea* em até 50% quando comparados ao tratamento Controle, os resultados para RT-PCR mostraram que cinco genes de defesa foram mais expressos *NbPR-1a*, *NbPR-14*, *Nb-AMCM*, *Nb-Acc* e *Nb-CHn* em plantas tratadas com PABA. O presente estudo mostrou que PABA induziu SAR em plantas de *N. benthamiana* sem reduzir o crescimento da planta, sendo assim esse produto apresenta potencial para uso no controle de doenças de plantas.

### Abstract

The use of vitamins including vitamins B1, B2 and K3 for the induction of acquired resistance (SAR) to protect plants against pathogens has been reported previously. The use of vitamin is safe both for man and the environment. In this study, para-aminobenzoic acid (PABA) was selected because induced SAR in *Nicotiana benthamiana* plants against the pathogen *Botrytis cinerea*. It was performed weekly applications of PABA into the soil (18 mmol/L) during one month and thereafter the pathogen was inoculated in leaves of the host. Patterns of plant growth and development of symptoms of the pathogen were analyzed, and further evaluated the expression of gene defenses such: *basic NbPR-2*, *NbPR-1a*, *NbPR-14*, *Nb-AMCM*, *Nb-CHn* and *Nb-ACC* by technic RT-PCR. It wasn't possible to measure reduction of plants growth treated with PABA in comparison with the control plants, treatment with PABA decreased the injury caused by *B. cinerea* in 50% when compared to the control treatment, the results for RT-PCR showed that five defense

genes were more expressed *NbPR-1a*, *NbPR-14*, *Nb-AMCM*, *Nb-Acc* and *Nb-CHn* in plants treated with PABA. This study showed that PABA induced SAR in *N. benthamiana* plants without reducing plant growth, so that product has a potential for use in the control of plant diseases.

**Palavras-chaves:** Resistência sistêmica adquirida, expressão genica, Vitamina Bx.

### **Introdução**

*Botrytis cinerea* é considerado o segundo fungo fitopatogênico mais importante (Dean et al., 2012), pois tem uma ampla gama de hospedeiros e causa doenças em pré e pós-colheita com forte impacto econômico. *B. cinerea* é um patógeno necrotrófico, isto é, que necessita matar o tecido vegetal antes da sua alimentação. Dessa forma, *B. cinerea* utiliza um conjunto de moléculas tóxicas (Williamson et al., 2007), bem como mecanismos de defesa da própria planta (Govrin et al., 2006) para destruir as células do hospedeiro.

Estresses de origem abiótica e biótica podem aumentar a síntese de determinados metabólitos secundários e moléculas de sinalização, e conseqüentemente alterar o conjunto de genes expressos (Bowler e Fluhr, 2000; Chen et al., 2002). Isso demonstra a especialização de mecanismos moleculares na tradução de sinais do ambiente em respostas adaptativas, que depende do tipo e intensidade do sinal recebido. Plantas apresentam diversas estratégias para se defenderem contra a infecção de patógenos. Alguns dessas estratégias são de alta especificidade e coevolúidas com a especialização do patógeno. Uma especialização conhecida se caracteriza pela existência de genes que são eficazes contra algumas raças da espécie do patógeno, chamadas interações gene a gene (Flor, 1971). Outros mecanismos de resistência promovem a proteção contra um amplo espectro de fungos, bactérias e vírus patogênicos. Exemplos desses tipos de resistência incluem resistência sistêmica adquirida (SAR) e resistência sistêmica induzida (ISR) (Dempsey et al., 1999; Pieterse et al., 1998). Estas reações foram descritas pela primeira vez por Rochow e Ross (1955) que identificaram um vírus que funcionava como elicitor reduzindo as doenças causadas por outros tipos de vírus em tabaco.

O ácido para-aminobenzóico (PABA) é um ciclo amino que pertence a vitaminas do grupo B e também é referido como vitamina Bx. PABA é sintetizado por bactérias, fungos e plantas (Maki e Takeda, 1985). Na medicina, é comumente utilizado como droga protetiva contra desordens de pele e tumores de pele causados pela exposição à radiação

ultravioleta, como a doença de Peyronie (Osgood et al., 1982). PABA é necessário para a síntese de ácido fólico, pois é um componente da vitamina B. PABA não é produzido por mamíferos, mas é fornecido pela alimentação e por bactérias simbióticas (Maki e Takeda, 1985). Certas propriedades de PABA têm sido relatadas recentemente, como a ativação da síntese de interferom, o qual apresenta um importante efeito antiviral (Akberova, 2002). Na China, PABA foi reportado pela primeira vez controlando doenças fúngicas de plantas se fazendo necessário elucidar quais mecanismos celulares e moleculares estão envolvido nesse processo (Kelman e Cook, 1977). Assim, há necessidade de estudar o papel de PABA como elicitor de SAR em plantas contra fitopatógenos, necessitando compreender quais mecanismos de resistência são possíveis de serem induzidos com a utilização de PABA.

## **Material e Métodos**

### **Material biológico**

Plantas de *Nicotiana benthamiana* foram obtidas em substrato Sunshine LA-4 Mix (Sun Gro Horticulture Canada Ltd) em sala climatizada com temperatura de 22 °C e fotoperíodo de 16 h, com uma intensidade luminosa de 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . O reagente ácido para-aminobenzóico (PABA) (MP Biomedicals, LLC, 29525 Fountain Parkway Solon, OH 44139, United States) foi diluído em água destilada esterilizada até a concentração de 18 mmol/L, sendo adicionado 15 mL da solução no solo, de cada vaso (0,3 L de substrato) contendo uma planta de *N. benthamiana*. As plantas começaram a ser tratadas com PABA aos 14 dias de idade (1 DPT – dias após tratamento), sendo reaplicado uma vez por semana o tratamento com PABA se repetiu a cada 1 semana durante um mês (8, 15 e 22 DPT), até o dia momento da inoculação com o patógeno (23 DPT). Plantas controle foram tratadas apenas com água destilada esterilizada.

### **Inoculação do patógeno**

*Botrytis cinerea* isolado B05.10, fornecido pelo Institut National de la Recherche Agronomique (Versailles, França) foi multiplicado em meio batata dextrose ágar (BDA – Difco) em câmara de crescimento a 22 °C e luz fluorescente contínua, sendo que os conídios foram coletados com 10 – 12 dias de idade. A suspensão do inóculo foi preparada em uma solução contendo 0,5 g L<sup>-1</sup> glucose e 0,5 g L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, na concentração de 10<sup>6</sup>

conídios mL<sup>-1</sup>. A suspensão foi pré-incubada sem agitação por 2 a 3 horas antes da inoculação.

Uma alíquota de 35 µL da suspensão foi aplicada no centro de folhas de *N. benthamiana* utilizando o método de Ingle e Roden (2014), com auxílio de uma capa plástica cobrindo a área de inoculação. Após inoculação, as plantas foram colocadas em caixas plásticas e incubadas a temperatura de 22 °C, com fotoperíodo de 16 horas. Cada caixa continha 1 L de água na base dos vasos para manutenção constante da umidade (≥ 95%). A avaliação foi realizada aos 2, 3 e 4 dias após a inoculação (25, 26 e 27 DPT), determinando-se a altura das plantas, o tamanho das folhas e a área da lesão causada por *B. cinerera*. Dados de área de lesão e tamanho de folhas foram avaliados com o auxílio do software Image J.

### **Coleta de Materiais**

Folhas de *N. benthamiana* foram coletadas antes do tratamento com PABA (0 DPT), um dia após o tratamento (1 DPT) e subsequentemente um dia depois do tratamento com PABA, durante um mês (9, 16 e 23 DPT). Por último, foram coletadas folhas de plantas inoculadas com o patógeno (24, 25, 26 e 27 DPT). Em cada data de coleta foram avaliados o tamanho de folhas e altura das plantas, como descritos anteriormente.

### **Extração de RNA e síntese de cDNA**

Todas as amostras coletadas foram imediatamente estocadas em freezer -80 °C antes da extração. Cada amostra contendo de 2 a 3 g de material vegetal foi macerada em almofariz com uma solução de extração (One Step RNA reagent bio basic Inc. 160 Torbay Road Markham Ontario L3R 1G6 Canada) e o RNA foi extraído seguindo o método de Chen et al. (2000), exceto que fenol:cloroformio foram adicionados antes da homogeneização com o tampão (200 mM de base Tris, 400 mM KCl, 200 mM de sucrose, 35 mM MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O e 25 mM EDTA, pH 9). As amostras de RNA foram ressuspendidas em 25-50 µl DEPC-Water (Água tratada com Dietil Pirocarbonato) e novamente estocado em freezer a -80 °C. cDNA de cadeia simples foi sintetizado usando o kit qScript™ cDNA SuperMix (Quanta BioSciences). Todas as reações de PCR foram realizadas utilizando um termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf, Mississauga, ON).

## RT-PCR

A RT-PCR foi realizada envolvendo a co-amplificação do produto de um gene constitutivo de controle de *N. benthamiana* fator-1 $\alpha$  tradutor de alongamento (*NbEF-1 $\alpha$* ). Esse é um gene de interesse e foi utilizado para avaliar os níveis de transcrição relativo (Dean et al., 2002). A sequencia do primer para *NbEF1 $\alpha$*  foi obtida do trabalho de Cortes-Barco et al. (2010) que gerou uma banda do tamanho de 296 pb.

RT-PCR foram realizadas com 15  $\mu$ l de reação, sendo 0,75  $\mu$ l de cDNA, 0,75 unidades de Tsg polimerase (Biobasic, Toronto, ON), 10  $\times$  Tsg tampão polimerase, 0,33 mM dNTPs, e 2,4 mM Mg<sup>2+</sup>, com 0,83  $\mu$ M de cada primer (Dean et al., 2002). As condições para amplificação consistiram em 1 ciclo de 94 °C por 3 min seguidos de 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos; e 72 °C por 1 min, o qual teve um ciclo de extensão final de 10 min a 72 °C. A temperatura de anelamento de todos os primers testados foi de 55 °C (Tabela 1).

Os produtos do RT-PCR foram separados em gel de TAE a 1% de agarose contendo 1% de brometo de etidíó. Visualização das bandas foi conduzida usando um transiluminador de UV e as imagens obtidas foram capturadas com um auxílio de uma câmera. As imagens foram salvas em arquivos .tiff, e a quantificação foi feita utilizando o software ImageJ (Scion Corporation, Frederick, MD, USA). Foram quantificadas as intensidades das bandas para cada gene de interesse (basic *NbPR-2*, *NbPR-1a*, *NbPR-14*, *Nb-AMCM*, *Nb-CHn* e *Nb-Acc*) e o controle constitutivo (*NbEF-1 $\alpha$* ). Os valores de expressão relativa foram calculados tomando com base a intensidade da banda do gene de interesse através da banda de *NbEF-1 $\alpha$*  para normalizar as concentrações de RNA.

## Análise dos dados

Cada experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com três repetições. Para avaliações de tamanho de folha e comprimento de plantas foram escolhidas seis plantas de cada tratamento, sendo avaliadas do dia 0 DPT ao 27 DPT. Os dados da expressão gênica foram compostos de três repetições, sendo cada amostra avaliada por duas vezes. Os dados das três repetições experimentais invariavelmente resultaram em efeitos do tratamento nas mesmas classes de significância; portanto, os dados foram agrupados para análise. Cálculos estatísticos foram realizados com auxílio do software Statistical Analysis Systems (SAS Institute Inc., Cary, NC). Dados de expressão genica e tamanho de plantas foram analisados utilizando análise de variância (ANOVA).

## Resultados

### Desenvolvimento das plantas e severidade da doença

As plantas de *N. benthamiana* tratadas ou não com PABA não apresentaram diferença significativa na altura (Figura 1A) e no tamanho de folhas (Figura 1B), independentemente da época de avaliação. Por outro lado, o tratamento com PABA reduziu significativamente o diâmetro das lesões causadas pelo *B. cinerea*, em todos os dias avaliados, isto é aos 25, 26 e 27 DPT (Figura 1C),

### Expressão dos genes (basic *NbPR-2*, *NbPR-1a*, *NbPR-14*, *Nb-AMCM*, *Nb-CHn* e *Nb-Acc*).

Para o gene *NbPR-14* (Figura 2A) não houve diferença entre os tratamentos até o dia 23 DPT, porém, houve um aumento da expressão desse gene após a inoculação do patógeno nas plantas tratadas com PABA,. Antes da inoculação houve muita variação da expressão do gene *Nb-AMCM* (Figura 2B), no entanto, após a inoculação do patógeno, no tratamento com PABA, houve um rápido aumento até o dia 25 DPT, diminuindo gradativamente no final do experimento. Para o gene basic *Nb-PR2* (Figura 2C), a partir do dia da inoculação houve um aumento de sua expressão, porém não houve diferença de efeito em relação ao tratamento controle. Para o gene *NbPR-1A* (Figura 2D) houve um aumento antecipado da expressão do gene no tratamento PABA, no entanto, os tratamentos voltaram a equiparar-se na expressão desse gene no 24 DPT ambos. A expressão do gene *Nb-Amch* (Figura 2E) no tratamento PABA foi maior a partir do dia 24 DPT que se seguiu em todo o período de avaliação. Finalmente, o gene *Nb-Acc* (Figura 2F) apresentou maior expressão durante todo o experimento. Entretanto, houve, no dia 23 DPT, uma redução drástica em ambos os tratamento, não havendo diferença significativa entre os tratamentos.

## Discussão

De acordo com os dados apresentados na Figura 1, pode-se afirmar que plantas tratadas com PABA não interferiram no desenvolvimento das plantas, mas essas se mostraram mais resistentes a ação do patógeno quando comparadas com o tratamento controle.

Ativadores de SAR e ISR, poderão ser importantes componentes para programas de manejo de doença e estão sendo desenvolvidos para aplicações agrícolas, com uma gama de produtos disponíveis no mercado, tais como: Oryzmate™ (Meiji Seika Pharma,

Tóquio, Japão), com o ingrediente ativo, probenazole (3-aliloxi-1,2-benzotiazole 1,1-dióxido) e Actigard<sup>TM</sup>, também comercializado como Bion<sup>TM</sup> (Novartis, East Hanover, U.S.A.) que apresenta 50% de ingrediente ativo BTH (benzo((1,2,3)-thidiazole-7-carbothioic S-methyl ester). Além desses produtos químicos, vitaminas tem recebido atenção como indutores de ISR, porque são de baixo custo e seguras ao ambiente. No presente estudo, identificou-se que PABA, do grupo da vitamina B, como indutor de ISR, sendo este produto descrito como capaz de reduzir doenças bacterianas e virais em plantas de pimenta em condições de campo (Song et al., 2013). Em contraste ao controle químico de patógenos de plantas, produtos que induzam ISR são vantajosos, porque seus efeitos são duradouros e de amplo espectro. BTH, por exemplo, é capaz de proteger plantas contra agentes patogênicos por até 10 dias (Gorlach et al., 1996).

Na ISR, a expressão de genes está ligada à síntese de proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas) e tem sido mostrada que aumenta depois de tratado com ácido salicílico, BTH ou ativadores biológicos (Friedrich et al., 1996; Van Loon e Van Strien, 1999) e com PABA nesse trabalho. O BTH induz a expressão de genes PR-1A, PR-3q e ácido PR-5 em *N. tabacum* (Friedrich et al., 1996). *PR-1A* é um dos genes expressos mais abundantes, depois de induções biológicas ou químicas d ISR, portanto, é um dos mais comuns marcadores usados para ISR (Van Loon e Van Strien, 1999). Embora não esteja claro a função de *PR-1A*, tem sido detectado que proteínas *PR-1* estão associadas com proteínas hospedeiras de parede celular e papilas produzidos pelas raízes de tabaco, em resposta a *Chalara elegans*, indicando um papel no aumento da resistência mecânica dessas estruturas relacionadas com as estruturas de defesa (Tahiri-Alaoui et al., 1993). Os resultados do presente estudo mostram que a expressão do gene *NbPR-1A* foi induzida significativamente após o tratamento PABA depois de 12 h (Figura 2C). Isto é, semelhante à expressão *NtPR-1A* em *N. tabacum* após tratamento com BTH (Friedrich et al., 1996). A expressão de *NtPR-1A* não foi detectada em folhas saudáveis antes do tratamento, assim como em plantas saudáveis de *N. tabacum*, onde a expressão foi indetectável (Friedrich et al., 1996).

A importância de ACC oxidase na interação planta-patógeno está descrita no trabalho de Shan e Goodwin (2006), onde o aumento da expressão de *NbACO1* em *N. Benthamiana*, inoculadas com *C. Orbiculare*, mostrou que ACC oxidase pode desempenhar um papel importante na resposta de *N. benthamiana* a infecção do patógeno. No presente trabalho foi possível visualizar que PABA aumentou a expressão desse gene

em plantas de *N. benthamiana* (Figura 2F). A fim de avaliar o papel no desenvolvimento da doença, *NbACO1* foi silenciado por VIGS (Baulcombe, 1999) e neste trabalho foi observado um elevado grau de silenciamento que resultaram em baixos níveis de *NbACO1* transcritos quando comparados com as plantas do tratamento controle. O silenciamento resultou que ACC oxidase desempenhou um papel importante na interação de um maior número de lesões, quando comparado com as plantas do tratamento controle que não foram silenciadas. ACC oxidase também apresenta papel na maturação de flores de *Cucumis sativus* (Kahana et al., 1999).

O gene basic *NbPR-2* codificam  $\beta$  - 1,3-glucanases que são genes regulados pela síntese de etileno (Arshad e Frankenberger, 2002). No entanto, a expressão de *NbPR2* não se mostrou afetada nas plantas tratadas por PABA (Figura 2C). Uma possível explicação para isso é que basic *NbPR-2* requer apenas uma pequena quantidade de etileno para ser regulamentado, e portanto, não foi suficientemente afetado pelo nível de produção de etileno em plantas tratadas por PABA, ou o gene também pode ter sido afetado por outro fator que também não foi alterado pelo tratamento com PABA, exatamente como descrito por Lieberherr et al. (2003) onde o gene Glutathione-S-transferase é regulamentado pela combinação de ácido salicílico e etileno.

A proteína de transferência de lipídios não-específico (*PR14*) é importante na transdução de moléculas de lipídios como ácido jasmônico (Maldonado et al., 2002). O ácido jasmônico (AJ) e seus derivados (jasmonatos) estão relacionados a mecanismos de defesa vegetal e induzem a expressão de genes que codificam proteínas específicas, como inibidores de proteases, enzimas envolvidas com a produção de flavonóides e diferentes proteínas relacionadas com doenças (Edreva, 2005). Também desempenham ainda papel importante na defesa das plantas contra danos causados pela radiação UV-B (Schaller, 2001). Essa mesma proteína também é relacionada à alimentação humana, pois pode ser considerada alergênica para certas pessoas (Breiteneder e Mills, 2005). O gene *Nb-PR14* também teve sua expressão aumentada em plantas tratadas (Figura 2A).

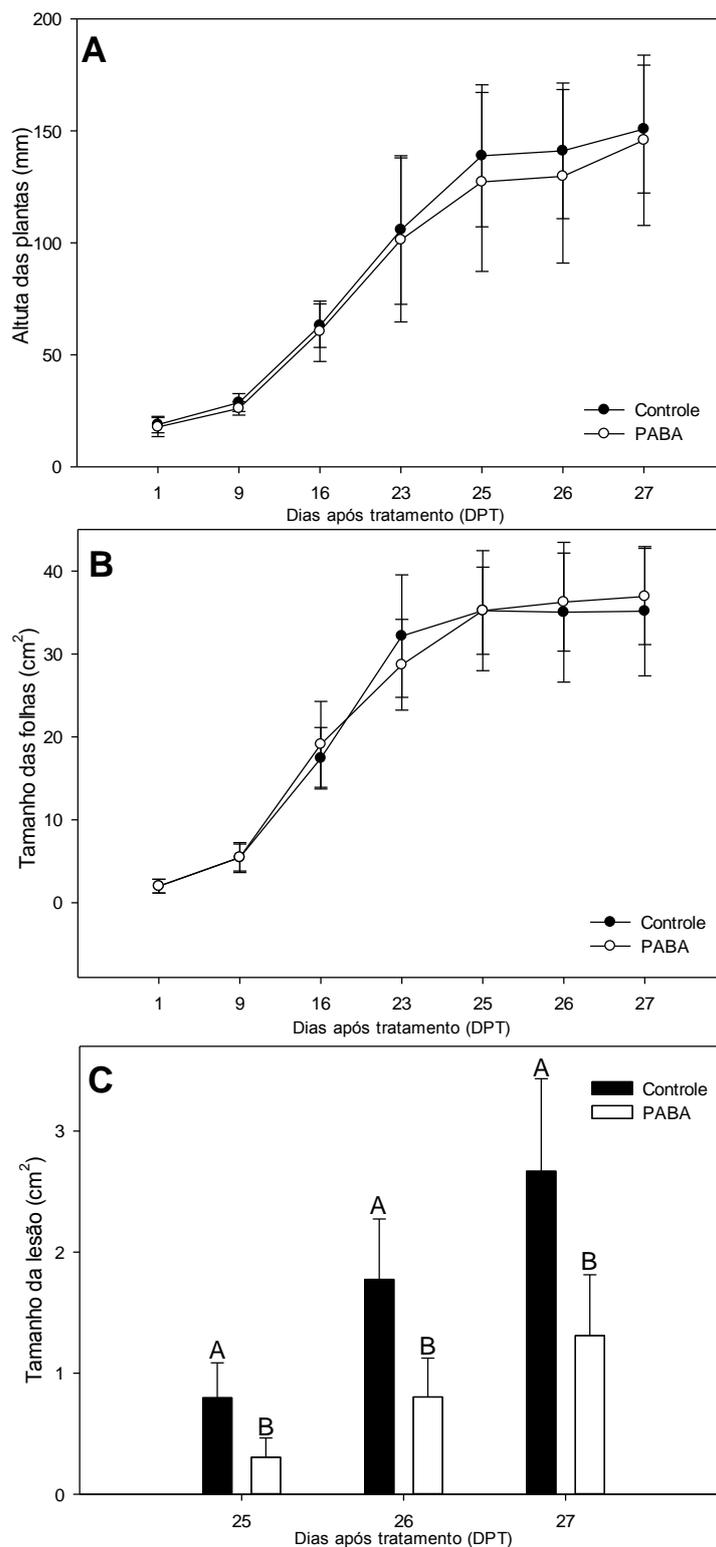
Os resultados obtidos no presente estudo com PABA indica que pode ser utilizado como indutor de resistência em plantas contra fitopatógenos. O produto não reduziu nenhum dos parâmetros de crescimentos avaliados e plantas tratadas com PABA foram capazes de reduzir as lesões de *B. cinerea* devido ao aumento da expressão de genes de resistência contra o patógeno.

### Referências bibliográficas

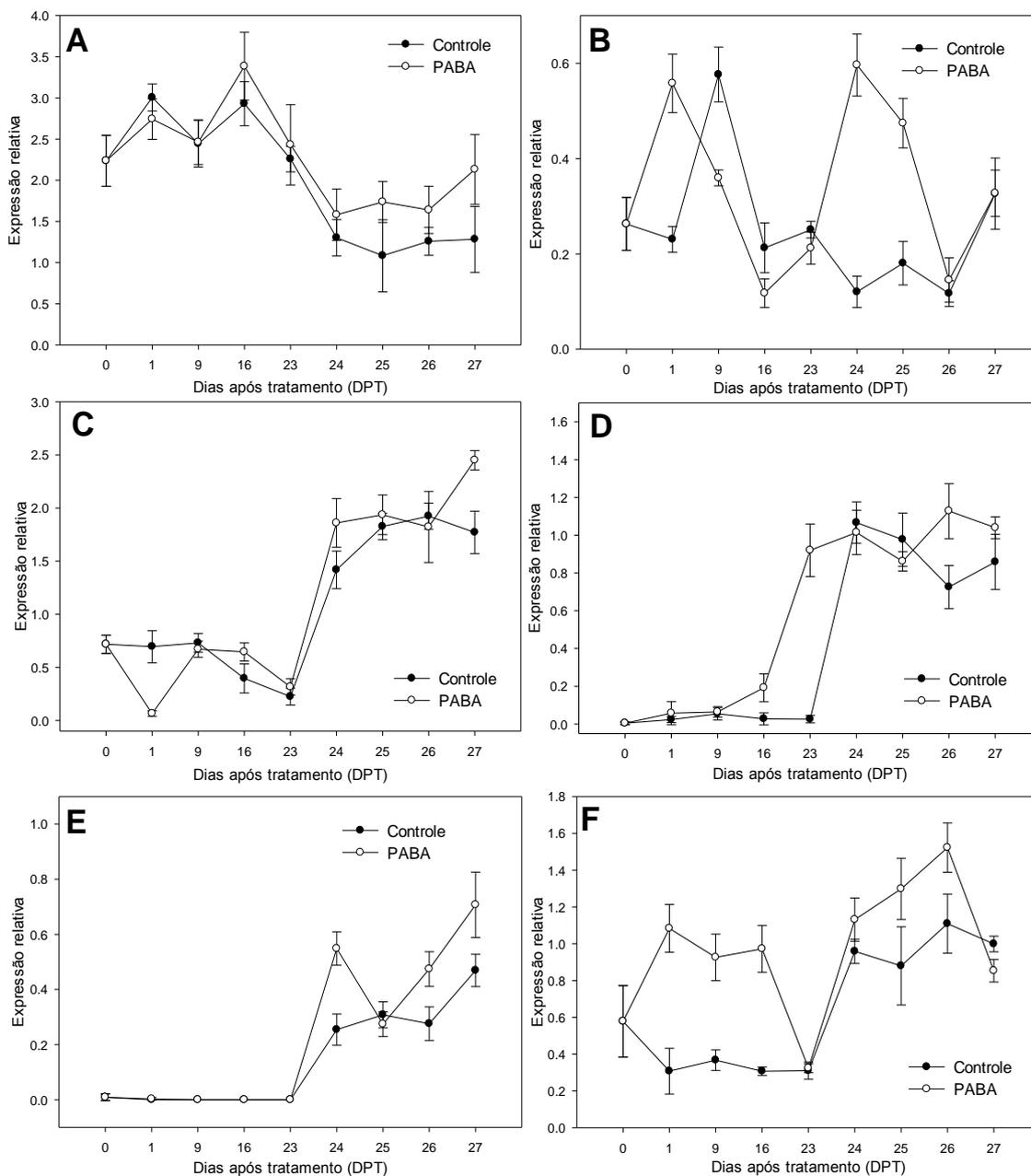
- Akberova S.I. (2002) New biological properties of p-aminobenzoic acid. *Biology Bulletin* 29:390-393.
- Arshad M., Frankenberger W.T. (2002) *Ethylene: Agricultural Resources and Applications* Kluwer Academic Press, New York.
- Baulcombe D.C. (1999) Fast forward genetics based on virus induced gene silencing. *Current Opinion in Plant Biology* 2:109-113.
- Bowler C., Fluhr R. (2000) The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. *Trends in Plant Science* 5:241-246.
- Breiteneder H., Mills C. (2005) Nonspecific lipid-transfer proteins in plant foods and pollens: an important allergen class. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 5:275-279.
- Chen G.Y.J., Jin S., Goodwin P.H. (2000) An improved method for the isolation of total RNA from *Malva pusilla* tissues infected with *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal of Phytopathology Phytopathologische Zeitschrift* 148:57-60.
- Chen W., Provart N.J., Glazebrook J., Katagiri F., Chang H.S., Eulgem T., Mauch F., Luan S., Zou G., Whitham S.A., Budworth P.R., Tao Y., Xie Z., Chen X., Lam S., Kreps J.A., Harper J.F., Si-Ammour A., Mauch-Mani B., Heinlein M., Kobayashi K., Hohn T., Dangl J.L., Wang X., Zhu T. (2002) Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell* 14:559-74.
- Cortes-Barco A.M., Goodwin P.H., Hsiang T. (2010) Comparison of induced resistance activated by benzothiadiazole, (2R,3R)-butanediol and an isoparaffin mixture against anthracnose of *Nicotiana benthamiana*. *Plant Pathology* 59:643-653.
- Dean J.D., Goodwin P.H., Hsiang T. (2002) Comparison of relative RT-PCR and northern blot analyses to measure expression of beta-1,3-glucanase in *Nicotiana benthamiana* infected with *Colltotrichum destructivum*. *Plant Molecular Biology Reporter* 20:347-356.
- Dean R., Van Kan J.A.L., Pretorius Z.A., Hammond-Kosack K.E., Di Pietro A., Spanu P.D., Rudd J.J., Dickman M., Kahmann R., Ellis J., Foster G.D. (2012) The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 13:414-430.
- Dempsey D.A., Shah J., Klessig D.F. (1999) Salicylic acid and disease resistance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 18:547-575.

- Edreva A. (2005) Pathogenesis related proteins: research progress in the last 15 years. *General and Applied Plant Physiology* 31:105-124.
- Flor H.H. (1971) Current status of gene for gene concept. *Annual Review of Phytopathology* 9:275-296.
- Friedrich L., Lawton K., Ruess W., Masner P., Specker N., Rella M.G., Meier B., Dincher S., Staub T., Uknes S., Mettraux J.P., Kessmann H., Ryals J. (1996) A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. *Plant Journal* 10:61-70.
- Gorlach J., Volrath S., KnaufBeiter G., Hengy G., Beckhove U., Kogel K.H., Oostendorp M., Staub T., Ward E., Kessmann H., Ryals J. (1996) Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell* 8:629-643.
- Govrin E.M., Rachmilevitch S., Tiwari B.S., Solomon M., Levine A. (2006) An elicitor from *Botrytis cinerea* induces the hypersensitive response in *Arabidopsis thaliana* and other plants and promotes the gray mold disease. *Phytopathology* 96:299-307.
- Ingle R., Roden L. (2014) Circadian regulation of plant immunity to pathogens, In: D. Staiger (Ed.), *Plant Circadian Networks*, Springer New York. pp. 273-283.
- Kahana A., Silberstein L., Kessler N., Goldstein R., Perl-Treves R. (1999) Expression of ACC oxidase genes differs among sex genotypes and sex phases in cucumber. *Plant Molecular Biology* 41:517-528.
- Kelman A., Cook R.J. (1977) Plant pathology in peoples republic of China. *Annual Review of Phytopathology* 15:409-429.
- Lieberherr D., Wagner U., Dubuis P.-H., Métraux J.-P., Mauch F. (2003) The Rapid Induction of Glutathione S-Transferases AtGSTF2 and AtGSTF6 by Avirulent *Pseudomonas syringae* is the Result of Combined Salicylic Acid and Ethylene Signaling. *Plant and Cell Physiology* 44:750-757.
- Maki T., Takeda K. (1985) Benzoic acid and derivatives, In: F. Ullmann, et al. (Eds.), *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*, VCH, Weinheim, Federal Republic of Germany; Deerfield Beach, FL, USA.
- Maldonado A.M., Doerner P., Dixon R.A., Lamb C.J., Cameron R.K. (2002) A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in *Arabidopsis*. *Nature* 419:399-403.

- Osgood P.J., Moss S.H., Davies D.J.G. (1982) The sensitization of near ultraviolet radiation killing of mammalian cell by the sunscreen agent para-aminobenzoic acid. *Journal of Investigative Dermatology* 79:354-357.
- Pieterse C.M.J., van Wees S.C.M., van Pelt J.A., Knoester M., Laan R., Gerrits N., Weisbeek P.J., Van Loon L.C. (1998) A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10:1571-1580.
- Rochow W.F., Ross A.F. (1955) Virus multiplication in plants doubly infected by potato virus X and virus Y. *Virology* 1:10-27.
- Schaller F. (2001) Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid derived signalling molecules. *Journal of Experimental Botany* 52:11-23.
- Shan X.C., Goodwin P.H. (2006) Silencing an ACC oxidase gene affects the susceptible host response of *Nicotiana benthamiana* to infection by *Colletotrichum orbiculare*. *Plant Cell Reports* 25:241-247.
- Song G.C., Choi H.K., Ryu C.-M. (2013) The folate precursor para-aminobenzoic acid elicits induced resistance against *Cucumber mosaic virus* and *Xanthomonas axonopodis*. *Annals of Botany* 111:925-934.
- Tahiri-Alaoui A., Dumas Gaudot E., Gianinazzi S. (1993) Immunocytochemical localization of pathogenesis related PR-1 proteins in tobacco root tissues infected in vitro by black root rot fungus *Chalara elegans*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 42:69-82.
- Van Loon L.C., Van Strien E.A. (1999) The families of pathogenesis related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55:85-97.
- Williamson B., Tudzynsk B., Tudzynski P., van Kan J.A.L. (2007) *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology* 8:561-580.



**Figura 1.** A) Altura média (mm) das plantas e (B) tamanho médio das folhas (cm<sup>2</sup>) de *Nicotiana benthamiana* em diferentes dias após tratamento (DPT); C) tamanho das lesões de folhas inoculadas com *Botrytis cinerea*. Curvas e barras significam a média dos valores mais desvio padrão de três experimentos independentes.



**Figura 2.** RT-PCR dos genes (A) *NbPR-14*, (B) *Nb-AMCM*, (C) Basic *NbPR-2*, (D) *NbPR-1a*, (E) *Nb-CHn* e (F) *Nb-ACC* expressos em folhas de *Nicotiana benthamiana*. Plantas foram inoculadas com *Botrytis cinerea* no dia 23 dias pós tratamento. A quantidade de *NbPR-14*, *Nb-AMCM*, Basic *NbPR-2*, *NbPR-1a*, *Nb-CHn* e *Nb-ACC* mRNA foram determinadas a partir da quantidade relativa de mRNA *NbEF-1a*. Médias são apresentadas com barras de erro padrão calculadas sobre três repetições biológicas e duas replicações.

**Tabela 1.** Primers utilizados para a amplificação de NbEF1 $\alpha$  (controle) e genes relacionados a SAR em *Nicotiana benthamiana* tratados com ácido para-aminobenzóico (PABA).

Nome dos genes	Fonte	Nomes dos Primers	Forward (F) e Reverse (R) primers	Tamanho da banda de PCR (pb)
<i>NbEF1<math>\alpha</math></i>	Cortes-Barco et al. (2010)	NbEF1 $\alpha$ _F630 NbEF1 $\alpha$ _R925	F: 5'- TACAACCCTGACAAGATTCC-3' R: 5'- GAGCTTCGTGGTGCATCT-3'	295 pb
Basic <i>NbPR-2</i>	Cortes-Barco et al. (2010)	NbPR2F NbPR2R	F: 5'- CATCACAGGGTTCGTTTAGGA-3' R: 5'- GGGTTCCTTGTTGTTCTCATCA-3'	442 bp
<i>NbPR-1a</i>	Cortes-Barco et al. (2010)	NbPR1aF NbPR1aR	F: 5'- TGGSATTTRTCTCTTTTCAC-3' R: 5'- CCTGGAGGATCATAGTTGC-3'	478 pb
<i>NbPR-14</i>		25700PR-14F 25700PR-14R	F: 5'- GCTCCTACTCCCCAAAGCAT-3' R: 5'- GACCTTGGAGCAGTCAGTGG-3'	523 pb
<i>Vb-AMCM</i>		22202F 22202R	F: 5'- CCATGGCTCTTTGGTTGAAT-3' R: 5'- TCTCCTCGTGACAGCCTCTT-3'	498 bp
<i>Nb-CHn</i>		29598F 29598R	F: 5'- GCTAATTGTCCTGCCAAAGG-3' R: 5'- GGCTTTGGTTGTTGAGGTGT-3'	517 bp
<i>Nb-ACC</i>		692270AccF 692270AccR	F: 5'- CTGTACAAGCTGAGGTTACTGA-3' R: 5'- GCTGGTGCTGGAAATATTACTG-3'	519 pb

<sup>a</sup>S = G or C; R = A or G.

## 5. CONCLUSÕES

Os isolados de *Botrytis cinerea* apresentaram diferença na tolerância à radiação UV-B.

*Clonostachys rosea* teve reduzida a sua capacidade antagônica a *B. cinerea* com o aumento da radiação ultravioleta.

PABA aumentou a expressão de genes relacionados com a resistência de plantas de *Nicotiana benthamiana* e reduziu o tamanho de lesões causadas por *Botrytis cinerea*.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, I. P.; KIM, S.; LEE, Y. H. Vitamin B-1 functions as an activator of plant disease resistance. **Plant Physiology**, v. 138, n. 3, p. 1505-1515, 2005.

AINSWORTH, E. A.; DAVEY, P. A.; BERNACCHI, C. J.; DERMODY, O. C.; HEATON, E. A.; MOORE, D. J.; MORGAN, P. B.; NAIDU, S. L.; RA, H. S. Y.; ZHU, X. G.; CURTIS, P. S.; LONG, S. P. A meta analysis of elevated CO<sub>2</sub> effects on soybean (*Glycine max*) physiology, growth and yield. **Global Change Biology**, v. 8, n. 8, p. 695-709, 2002.

AKBEROVA, S. I. New biological properties of p-aminobenzoic acid. **Biology Bulletin**, v. 29, n. 4, p. 390-393, 2002.

ALEANDRI, M. P.; REDA, R.; TAGLIAVENTO, V.; MAGRO, P.; CHILOSI, G. Effect of chemical resistance inducers on the control of *Monosporascus* root rot and vine decline of melon. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 49, n. 1, p. 18-26, 2010.

ALVARADO GUTIERREZ, A.; DEL REAL MONROY, M.; RODRIGUEZ GUERRA, R.; ALMANZA SANCHEZ, L.; LOZOYA GLORIA, E.; FRAIRE VELAZQUEZ, S. 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**, v. 72, n. 4-6, p. 111-121, 2008.

AMILS, R.; ELLIS EVANS, C.; HINGHOFER SZALKAY, H.; BISCHOF, K.; GÓMEZ, I.; MOLIS, M.; HANELT, D.; KARSTEN, U.; LÜDER, U.; ROLEDA, M. Y.; ZACHER, K.; WIENCKE, C. Ultraviolet radiation shapes seaweed communities. In: (Ed.). **Life in Extreme Environments**: Springer Netherlands, p.187-212. 2007.

ANTOIGNONI, F.; ZHENG, S. P.; PAGNUCCO, C.; BARALDI, R.; POLI, F.; BIONDI, S. Induction of flavonoid production by UV-B radiation in *Passiflora quadrangularis callus* cultures. **Fitoterapia**, v. 78, n. 5, p. 345-352, 2007.

BALLARÉ, C. L. Stress under the sun: Spotlight on ultraviolet-B responses. **Plant Physiology**, v. 132, n. 4, p. 1725-1727, 2003.

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

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

BOFF, P.; KOHL, J.; GERLAGH, M.; DE KRAKER, J. Biocontrol of grey mould by *Ulocladium atrum* applied at different flower and fruit stages of strawberry. **Biocontrol**, v. 47, n. 2, p. 193-206, 2002.

BOXALL, A. B. A.; HARDY, A.; BEULKE, S.; BOUCARD, T.; BURGIN, L.; FALLOON, P. D.; HAYGARTH, P. M.; HUTCHINSON, T.; KOVATS, R. S.; LEONARDI, G.; LEVY, L. S.; NICHOLS, G.; PARSONS, S. A.; POTTS, L.; STONE, D.; TOPP, E.; TURLEY, D. B.; WALSH, K.; WELLINGTON, E. M. H.; WILLIAMS, R. J. Impacts of climate change on indirect human exposure to pathogens and chemicals from agriculture. **Environmental Health Perspectives**, v. 117, n. 4, p. 508-514, 2009.

BRAGA, G. U. L.; FLINT, S. D.; MESSIAS, C. L.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Effect of UV-B on conidia and germlings of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. **Mycological Research**, v. 105, p. 874-882, 2001.

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

CALDWELL, M. M.; BJORN, L. O.; BORNMAN, J. F.; FLINT, S. D.; KULANDAIVELU, G.; TERAMURA, A. H.; TEVINI, M. Effects of increased solar ultraviolet radiation on terrestrial ecosystems. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 46, n. 1-3, p. 40-52, 1998.

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

CARD, S. D.; WALTER, M.; JASPERS, M. V.; AZTEJNBERG, A.; STEWART, A. Targeted selection of antagonistic microorganisms for control of *Botrytis cinerea* of strawberry in New Zealand. **Australasian Plant Pathology**, v. 38, p. 183 - 192, 2009.

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

COTA, L. V.; MAFFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S.; MACEDO, P. E.; ANTUNES, R. F. Biological control of strawberry grey mould by *Clonostachys rosea* under field conditions. **Phytopathology**, v. 98, n. 6, p. S41-S42, 2008.

DIETRICH, R.; PLOSS, K.; HEIL, M. Growth responses and fitness costs after induction of pathogen resistance depend on environmental conditions. **Plant Cell and Environment**, v. 28, n. 2, p. 211-222, 2005.

DONG, H.; BEER, S. V. Riboflavin induces disease resistance in plants by activating a novel signal transduction pathway. **Phytopathology**, v. 90, n. 8, p. 801-811, 2000.

DONG, J. Y.; ZHAO, Z. X.; CAI, L.; LIU, S. Q.; ZHANG, H. R.; DUAN, M.; ZHANG, K. Q. Nematicidal effect of freshwater fungal cultures against the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. **Fungal Diversity**, v. 15, p. 125-135, 2004.

ELAD, Y.; ZIMAND, G.; ZAQS, Y.; ZURIEL, S.; CHET, I. Use of *Trichoderma harzianum* in combination or alternation with fungicides to control cucumber gray mold (*Botrytis cinerea*) under commercial greenhouse conditions. **Plant Pathology**, v. 42, n. 3, p. 324-332, 1993.

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

FREEMAN, S.; MINZ, D.; KOLESNIK, I.; BARBUL, O.; ZVEIBIL, A.; MAYMON, M.; NITZANI, Y.; KIRSHNER, B.; RAV-DAVID, D.; BILU, A.; DAG, A.; SHAFIR, S.; ELAD, Y. *Trichoderma* biocontrol of *Colletotrichum acutatum* and *Botrytis cinerea* and survival in strawberry. **European Journal of Plant Pathology**, v. 110, n. 4, p. 361-370, 2004.

GERM, M.; STIBILJ, V.; KREFT, S.; GABERSCIK, A.; KREFT, I. 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**, v. 122, n. 3, p. 471-474, 2010.

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

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

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

GUETSKY, R.; SHTIENBERG, D.; ELAD, Y.; DINOOR, A. Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. **Phytopathology**, v. 91, n. 7, p. 621-627, 2001.

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

HADER, D. P.; KUMAR, H. D.; SMITH, R. C.; WORREST, R. C. Aquatic ecosystems: effects of solar ultraviolet radiation and interactions with other climatic change factors. **Photochemical Photobiological Sciences**, v. 2, n. 1, p. 39-50, 2003.

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

HANNUKKALA, A. O.; KAUKORANTA, T.; LEHTINEN, A.; RAHKONEN, A. 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**, v. 56, n. 1, p. 167-176, 2007.

HEIL, M.; HILPERT, A.; KAISER, W.; LINSENMAYER, K. E. Reduced growth and seed set following chemical induction of pathogen defence: does systemic acquired resistance (SAR) incur allocation costs? **Journal of Ecology**, v. 88, n. 4, p. 645-654, 2000.

HOLLANDSWORTH, S. M.; MCPETERS, R. D.; FLYNN, L. E.; PLANET, W.; MILLER, A. J.; CHANDRA, S. Ozone trends deduced from combined nimbus-7 sbuv and noaa-11 sbuv/2 data. **Geophysical Research Letters**, v. 22, n. 8, p. 905-908, 1995.

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

HONDA, Y.; TOKI, T.; YUNOKI, T. Control of gray mold of greenhouse cucumber and tomato by inhibiting sporulation. **Plant Disease Reporter**, v. 61, n. 12, p. 1041-1044, 1977.

IPCC. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. In: R.K., P. e A., R. (Ed.). **Climate Change 2007: Synthesis Report**. Cambridge University Press. Geneva, p.104. 2007.

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

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

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

KELMAN, A.; COOK, R. J. Plant Pathology in the People's Republic of China. **Annual Review of Phytopathology**, v. 15, n. 1, p. 409-429, 1977.

KOSTIC, N.; BOZANIC, M.; VUKOVIC, A. Diagnostic value of the NBT-PABA test in the functional evaluation of the exocrine pancreas. **Srp Arh Celok Lek**, v. 120, n. 9-10, p. 269-272, 1992.

KOTI, S.; REDDY, K. R.; REDDY, V. R.; KAKANI, V. G.; ZHAO, D. L. 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**, v. 56, n. 412, p. 725-736, 2005.

KOZHEVNIKOVA, N. A.; RAPOPORT, I. A. The recovery of alkaline ribonuclease-activity with the help of para-aminobenzoic acid. **Doklady Akademii Nauk Sssr**, v. 289, n. 4, p. 993-996, 1986.

KOZHEVNIKOVA, N. A.; RAPOPORT, I. A. The recovery of the pancreatic deoxyribonuclease activity with the help of Para-aminobenzoic acid. **Doklady Akademii Nauk SSSR**, v. 295, n. 4, p. 1009-1012, 1987.

KULUNCSICS, Z.; PERDIZ, D.; BRULAY, E.; MUEL, B.; SAGE, E. Wavelength dependence of ultraviolet-induced DNA damage distribution: involvement of direct or indirect mechanisms and possible artefacts. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 49, n. 1, p. 71-80, 1999.

KUNZ, B. A.; CAHILL, D. M.; MOHR, P. G.; OSMOND, M. J.; VONARX, E. J. Plant responses to UV radiation and links to pathogen resistance. **International Review of Cytology - A Survey of Cell Biology**, V. 255, p. 1-40, 2006.

KUNZ, B. A.; DANDO, P. K.; GRICE, D. M.; MOHR, P. G.; SCHENK, P. M.; CAHILL, D. M. UV-induced DNA damage promotes resistance to the biotrophic pathogen *Hyaloperonospora parasitica* in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 148, n. 2, p. 1021-1031, 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**, v. 152, n. 8-9, p. 465-470, 2004.

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

LIU, F.; WEI, F.; WANG, L.; LIU, H.; ZHU, X.; LIANG, Y. Riboflavin activates defense responses in tobacco and induces resistance against *Phytophthora parasitica* and *Ralstonia solanacearum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 74, n. 5–6, p. 330-336, 2010.

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

LYON, G. Agents That Can Elicit Induced Resistance. In: (Ed.). **Induced Resistance for Plant Defence**: Blackwell Publishing, p.9-29. 2007.

MACKIE, B. S.; MACKIE, L. E. The PABA story. **Australas Journal Dermatology**, v. 40, n. 1, p. 51-53, 1999.

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

MADRONICH, S.; MCKENZIE, R. L.; BJORN, L. O.; CALDWELL, M. M. Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 46, n. 1-3, p. 5-19, 1998.

MCELDRONE, A. J.; HAMILTON, J. G.; KRAFNICK, A. J.; ALDEA, M.; KNEPP, R. G.; DELUCIA, E. H. Combined effects of elevated CO<sub>2</sub> and natural climatic variation on leaf spot diseases of redbud and sweetgum trees. **Environmental Pollution**, v. 158, n. 1, p. 108-114, 2010.

MCKENZIE, R. L.; AUCAMP, P. J.; BAIS, A. F.; BJORN, L. O.; ILYAS, M. Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 6, n. 3, p. 218-231, 2007.

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

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**, v. 196, n. 4, p. 286-295, 2010.

MOORE, D.; BRIDGE, P. D.; HIGGINS, P. M.; BATEMAN, R. P.; PRIOR, C. Ultraviolet radiation damage to *Metarhizium flavoviride* conidia and the protection given by vegetable and mineral oils and chemical sunscreens. **Annals of Applied Biology**, v. 122, n. 3, p. 605-616, 1993.

MORANDI, M. A. B.; MAFFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S. G.; ALFENAS, A. C.; BARBOSA, J. G. Suppression of *Botrytis cinerea* sporulation by *Clonostachys rosea* on rose debris: a valuable component in Botrytis blight management in commercial greenhouses. **Biological Control**, v. 26, n. 3, p. 311-317, 2003.

MORANDI, M. A. B.; MAFFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S. G.; ALFENAS, A. C.; BARBOSA, J. G.; CRUZ, C. D. Relationships of microclimatic variables to colonization of rose debris by *Botrytis cinerea* and the biocontrol agent *Clonostachys rosea*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 16, n. 6, p. 619-630, 2006.

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

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

NICOT, P. C.; MERMIER, M.; VAISSIERE, B. E.; LAGIER, J. Differential spore production by *Botrytis cinerea* on agar medium and plant tissue under near ultraviolet light absorbing polyethylene film. **Plant Disease**, v. 80, n. 5, p. 555-558, 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**, v. 70, n. 5, p. 398-402, 1986.

OSGOOD, P. J.; MOSS, S. H.; DAVIES, D. J. G. The sensitization of near ultraviolet radiation killing of mammalian cell by the sunscreen agent Para-aminobenzoic acid. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 79, n. 6, p. 354-357, 1982.

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

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

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

PERCY, K. E.; AWMACK, C. S.; LINDROTH, R. L.; KUBISKE, M. E.; KOPPER, B. J.; ISEBRANDS, J. G.; PREGITZER, K. S.; HENDREY, G. R.; DICKSON, R. E.; ZAK, D. R.; OKSANEN, E.; SOBER, J.; HARRINGTON, R.; KARNOSKY, D. F. Altered performance of forest pests under atmospheres enriched by CO<sub>2</sub> and O<sub>3</sub>. **Nature**, v. 421, n. 6919, p. 190-190, 2003.

PHOENIX, G. K.; GWYNN-JONES, D.; CALLAGHAN, T. V.; SLEEP, D.; LEE, J. A. Effects of global change on a sub Arctic heath: effects of enhanced UV-B radiation and increased summer precipitation. **Journal of Ecology**, v. 89, n. 2, p. 256-267, 2001.

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

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

RABOLLE, M.; SPLIID, N. H.; KRISTENSEN, K.; KUDSK, P. Determination of fungicide residues in field-grown strawberries following different fungicide strategies against gray mold (*Botrytis cinerea*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 3, p. 900-908, 2006.

RANGEL, D. E. N.; BRAGA, G. U. L.; FLINT, S. D.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Variations in UV-B tolerance and germination speed of *Metarhizium anisopliae* conidia produced on insects and artificial substrates. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 87, n. 2-3, p. 77-83, 2004.

REDDY, N. P.; KHAN, P. A. A.; DEVI, K. U.; VICTOR, J. S.; SHARMA, H. C. Assessment of the suitability of Tinopal as an enhancing adjuvant in formulations of the insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. **Pest Management Science**, v. 64, n. 9, p. 909-915, 2008.

ROZEMA, J.; VANDESTAAIJ, J.; BJORN, L. O.; CALDWELL, M. UV-B as an environmental factor in plant life: Stress and regulation. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 12, n. 1, p. 22-28, 1997.

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

SCHROERS, H. J. A monograph of *Bionectria* (Ascomycota, Hypocreales, Bionectriaceae) and its *Clonostachys* anamorphs. **Studies in Mycology**, n. 46, p. 1-214, 2001.

SCHROERS, H. J.; SAMUELS, G. J.; SEIFERT, K. A.; GAMS, W. Classification of the mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys* as *C. rosea*, its relationship to *Bionectria ochroleuca*, and notes on other *Gliocladium* like fungi. **Mycologia**, v. 91, n. 2, p. 365-385, 1999.

SHEA, K. M.; TRUCKNER, R. T.; WEBER, R. W.; PEDEN, D. B. Climate change and allergic disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 122, n. 3, p. 443-453, 2008.

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

SONG, G. C.; CHOI, H. K.; RYU, C.-M. The folate precursor para-aminobenzoic acid elicits induced resistance against Cucumber mosaic virus and *Xanthomonas axonopodis*. **Annals of Botany**, v. 111, n. 5, p. 925-934, 2013.

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

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

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

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

TAHERI, P.; TARIGHI, S. A survey on basal resistance and riboflavin induced defense responses of sugar beet against *Rhizoctonia solani*. **Journal Plant Physiology**, v. 168, n. 10, p. 1114-1122, 2011.

TANHUA, T.; JONES, E. P.; JEANSSON, E.; JUTTERSTROM, S.; SMETHIE, W. M.; WALLACE, D. W. R.; ANDERSON, L. G. Ventilation of the Arctic Ocean: Mean ages and inventories of anthropogenic CO<sub>2</sub> and CFC-11. **Journal of Geophysical Research Oceans**, v. 114, n. C1, 2009.

TATAGIBA, J. D. S.; MAFFIA, L. A.; BARRETO, R. W.; ALFENAS, A. C.; SUTTON, J. C. Biological control of *Botrytis cinerea* in residues and flowers of rose (*Rosa hybrida*). **Phytoparasitica**, v. 26, n. 1, p. 8-19, 1998.

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

TIMUDO-TORREVILLA, O. E.; EVERETTI, K. R.; WAIPARA, N. W.; BOYD-WILSON, K. S. H.; WEEDS, P.; LANGFORD, G. I.; WALTER, M. Present status of strawberry fruit rot diseases in New Zealand. **New Zealand Plant Protection Society**, v. 58, p. 74-79, 2005.

TOLEDO, A. V.; VIRLA, E.; HUMBER, R. A.; PARADELL, S. L.; LASTRA, C. C. L. 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**, v. 92, n. 1, p. 7-10, 2006.

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

TSAI, M. L.; CHANG, K. Y.; CHIANG, C. S.; SHU, W. Y.; WENG, T. C.; CHEN, C. R.; HUANG, C. L.; LIN, H. K.; HSU, I. C. UV-B radiation induces persistent activation of ribosome and oxidative phosphorylation pathways. **Radiation Research**, v. 171, n. 6, p. 716-724, 2009.

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

VICCINI, G.; MARTINELLI, T. R.; COGNIALLI, R. C. R.; DE FARIA, R. O.; CARBONERO, E.; SASSAKI, G. L.; MITCHELL, D. A. Exopolysaccharide from surface-liquid culture of *Clonostachys rosea* originates from autolysis of the biomass. **Archives of Microbiology**, v. 191, n. 4, p. 369-378, 2009.

WILLIAMSON, B.; TUDZYNSKI, B.; TUDZYNSKI, P.; VAN KAN, J. A. L. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. **Molecular Plant Pathology**, v. 8, n. 5, p. 561-580, 2007.

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

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

ZHAO, D. L.; REDDY, K. R.; KAKANI, V. G.; MOHAMMED, A. R.; READ, J. J.; GAO, W. Leaf and canopy photosynthetic characteristics of cotton (*Gossypium hirsutum*) under elevated CO<sub>2</sub> concentration and UV-B radiation. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, n. 5, p. 581-590, 2004.