

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

**SENSIBILIDADE DE *Lecanicillium lecanii*, AGENTE DE
BIOCONTROLE DE *Hemileia vastatrix*, À RADIAÇÃO
ULTRAVIOLETA-B**

JOSÉ ABRAHÃO HADDAD GALVÃO

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP – Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU – SP

Junho – 2012

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

**SENSIBILIDADE DE *Lecanicillium lecanii*, AGENTE DE
BIOCONTROLE DE *Hemileia vastatrix*, À RADIAÇÃO
ULTRAVIOLETA-B**

JOSÉ ABRAHÃO HADDAD GALVÃO

Orientador: Dr. Wagner Bettiol

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP – Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU – SP

Julho – 2012

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

Galvão, José Abrahão Haddad, 1956-
G182s Sensibilidade de *Lecanicillium lecanii*, agente de bio-
controle de *Hemileia vastatrix*, à radiação ultravioleta-B
/ José Abrahão Haddad Galvão. - Botucatu : [s.n.], 2012
ix, 58 f. : il. color., gráfs., tabs. fots.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual
Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu,
2012

Orientador: Wagner Bettiol
Inclui bibliografia

1. Controle biológico. 2. *Hemileia vastatrix*. 3.
Mudanças climáticas. 4. Radiação ultravioleta. 5. UV-B. 6.
Verticillium lecanii. I. Bettiol, Wagner. II. Universi-
dade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus
de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. III.
Título.

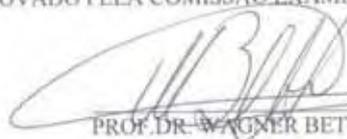
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "SENSIBILIDADE DE *Lecanicillium lecanii*, AGENTE DE BIOCONTROLE
DE *Hemileia vastatrix*, À RADIAÇÃO ULTRA VIOLETA-B"

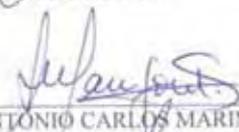
ALUNO: JOSÉ ABRAHÃO HADDAD GALVÃO

ORIENTADOR: PROF. DR. WAGNER BETTIOL

APROVADO PELA COMISSÃO EXAMINADORA:



PROF. DR. WAGNER BETTIOL



PROF. DR. ANTONIO CARLOS MARINGONI



PROF. DR. FLÁVIO HENRIQUE V. DE MEDEIROS

Data da Realização: 10 de agosto de 2012.

DEDICO

Aos meus pais **Dario Vieira Galvão e Yvonne Haddad Vieira Galvão**, pela oportunidade de vida e pelos valores ensinados com exemplos. Sei que de algum lugar eles acompanham a minha trajetória e faço para que tenham orgulho dela.

À minha esposa **Laura Umbelina Santi**, pelo companheirismo, apoio e paciência incondicionais, regados a vinhos, alegria e amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força em todos os momentos desta conquista.

Ao tempo, que insiste em me dar chances.

Ao Dr. Wagner Bettiol, pela partilha de uma vida profissional junto e agora como meu orientador neste mestrado.

A Laura Umbelina Santi, minha esposa querida, amiga e companheira.

À minha co-orientadora não oficial, amiga única e especial, Elida Barbosa Corrêa, por ouvir as minhas dificuldades e confidências e colaborar tanto para o meu aprendizado.

À Embrapa Meio Ambiente, pela compreensão do meu desejo em evoluir pessoal e profissionalmente, o que só é possível por meio de conhecimento e da dedicação, e também por continuar me apoiando durante o desenvolvimento e condução de minha pesquisa.

À UNESP/FCA, por acolher esse estudante temporão, depois de tantos anos de formado em Agronomia pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Proteção de Plantas: Antonio Carlos Maringoni, Edson Luis Furtado, Silvia Renata Siciliano Wilcken, Carlos Gilberto Raetano, Renate Krause Sakate, Raquel Ghini e Wagner Bettiol, pela oportunidade de aprender e de compartilhar experiências.

Aos amigos que compartilharam das minhas principais dificuldades e realizações nessa volta aos estudos, Cassiano Forner, Lúcio Bertoldo Costa e Luana Piermann.

Aos novos amigos que ganhei com este Mestrado: Miriam Fumiko Fujinawa, Zayame Vegette Pinto, Alexandre Visconti, Andiale Pinto dos Santos, Andressa Brida, Carlos Eduardo Oliveira da Silva, Daniel Hinz, Fernanda Ribeiro de Andrade Oliveira, Juliana Ferrari de Almeida Nogueira, Juliano César Silva, Liliana Patrícia Vital de Mattos, Lívia Mendes, Luciana Ávila, Lucivane Gonçalves, Luiz Alexandre Sereda, Maria Augusta de Camargo

Ferraz, Maria Fernanda Nobre, Marina Meloni Gorla, Michelli de Souza Santos, Mirian Lobo Saber, Raquel Temperani, Regiane Iost, Regiane Medice, Ricardo Contreira Lessin, Rodrigo Estevam de Oliveira MacLeod, Vanessa Bernardes, Vanessa Nessner Kavamura, Wallace Rafael de Souza e tantos outros já formados, que não pude lembrar o nome agora.

Agradeço ainda às minhas irmãs Eliana Haddad Galvão e Maria Yvonne Haddad Galvão Martos, que souberam compreender a minha distância nesse período.

Agradeço ainda à família Santi, que estranhou bastante a minha ausência nos almoços familiares e soube compreender que esta era uma etapa importante da minha vida.

Ao amigo de todas as horas, Carlos Paoliello Machado de Souza e nossos companheiros dos jantares às quartas-feiras, aos quais estive ausente.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	5
2. REVISÃO DE LITERATURA	8
2.1 Efeitos da radiação UV-B em doenças de plantas	10
2.2 Ferrugem do cafeeiro	14
2.3 Controle biológico e <i>Lecanicillium lecanii</i>	17
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1. Isolados de <i>Lecanicillium</i>	20
3.2. Multiplicação e preservação de <i>Lecanicillium</i>	21
3.3. Preparo das suspensões de conídios utilizadas nos experimentos.....	21
3.4. Germinação de conídios de <i>Lecanicillium</i>	22
3.5. Câmara de simulação de radiação UV-B	23
3.6. Efeito de distâncias das lâmpadas emissoras de radiação UV-B e tempos de incubação na germinação de conídios de <i>Lecanicillium</i>.....	25
3.7 Efeito da associação do tempo de exposição à radiação UV-B e do período de incubação na germinação de conídios de <i>Lecanicillium</i>.....	26
3.8 Efeito de doses de radiação UV-B na germinação de conídios de 10 isolados de <i>Lecanicillium</i>.	27
3.9 Estabelecimento da curva de sobrevivência de isolados de <i>Lecanicillium</i> expostos à radiação UV-B.	28
3.10 Sensibilidade dos conídios de <i>Lecanicillium</i> em diversos estádios de germinação à radiação UV-B.	29
3.11 Efeito da associação de radiação UV-B e concentração de CO₂ do ar na germinação de conídios de <i>Lecanicillium</i>.	29
3.12 Efeito da associação de radiação UV-B e temperatura na germinação de conídios de <i>Lecanicillium</i>	30

3.13 Efeito da radiação UV-B no estabelecimento de <i>Lecanicillium lecanii</i> , isolado CCMA 1143, em lesões de ferrugem do cafeeiro.....	31
3.14 Análise dos resultados	33
4. RESULTADOS.....	34
4.1. Efeito de distâncias das lâmpadas emissoras de radiação UV-B e tempos de incubação na germinação de conídios de <i>Lecanicillium</i>	34
4.2 Efeito da associação do tempo de exposição à radiação UV-B e do tempo de incubação na germinação de conídios de <i>Lecanicillium</i>	35
4.3 Efeito de doses de radiação UV-B na germinação de conídios de isolados de <i>Lecanicillium</i>	36
4.4 Estabelecimento da curva de sobrevivência de isolados de <i>Lecanicillium</i> expostos à radiação UV-B	37
4.5 Efeito da associação de radiação UV-B e temperatura na germinação de conídios de <i>Lecanicillium</i>	38
4.6 Efeito da associação de radiação UV-B e concentração de CO ₂ do ar na germinação de conídios de <i>Lecanicillium</i>	39
4.7 Sensibilidade dos conídios de <i>Lecanicillium</i> em diversos estádios de germinação à radiação UV-B.	40
4.8 Efeito da radiação UV-B no estabelecimento de <i>Lecanicillium lecanii</i> , isolado CCMA 1143, em lesões de ferrugem do cafeeiro.....	41
5. DISCUSSÃO	43
6. CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Origem dos isolados de <i>Lecanicillium</i> avaliados quanto à sensibilidade à radiação UV-B.	21
Tabela 2: Sensibilidade na germinação relativa (%) de conídios do isolado CCMA-1143 de <i>Lecanicillium lecanii</i> sob efeito de três doses de radiação UV-B e três tempos de incubação. 35	35
Tabela 3: Germinação de conídios (%) do isolado CCMA-1143 de <i>Lecanicillium lecanii</i> expostos por seis tempos à radiação UV-B e incubação por cinco períodos após a radiação...36	36
Tabela 4: Germinação relativa de conídios (%) de 10 isolados de <i>Lecanicillium lecanii</i> expostos a duas doses de radiação UV-B.	37
Tabela 5: Efeito da radiação UV-B associada às temperaturas de incubação na sensibilidade da germinação de conídios do isolado CCMA-1143 de <i>Lecanicillium lecanii</i>	39
Tabela 6: Efeito da radiação UV-B associada a quatro concentrações CO ₂ do ar na sensibilidade de germinação de conídios do isolado CCMA-1143 de <i>Lecanicillium</i>	40

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Efeito da radiação UV-B na germinação de *L. lecanii*: conídios observados em microscópio estereoscópico com aumento de 250 vezes: A=99%; B=80%; C=30% germinados.23
- Figura 2: Câmaras de radiação UV-B utilizadas em todos os estudos. Nessa ilustração, observa-se placas de Petri com meio de cultura onde os conídios estão expostos à radiação a 33 cm de distância das lâmpadas (A), Irradiação de conídios de *Lecanicillium* em discos de folha de cafeeiro onde se observa retângulos de papel alumínio protegendo os discos dos tratamentos sem exposição à radiação (B) e troca do filtro de acetato de celulose das lâmpadas (C).24
- Figura 3: Irradiâncias medidas com o espectrorradiômetro: A) Irradiância média no interior da câmara de UV-B; B) Maior radiação ultravioleta registrada no período do ensaio realizado ao meio dia sobre dia sem nuvens.25
- Figura 4: Irradiação de conídios de *Lecanicillium* em meio de cultura, com as placas de Petri expostas à radiação em três distâncias das lâmpadas UV-B.26
- Figura 5: Irradiação de *Lecanicillium* em meio de cultura. Observa-se papel alumínio sobre placas de Petri protegendo os conídios da radiação UV-B, colocados quando completado o tempo de exposição estabelecido para cada tratamento.27
- Figura 6: Bandeja com discos de folhas de café com os 4 tratamentos do experimento.....32
- Figura 7: Regressão da curva de sobrevivência à radiação UV-B e DL_{50} para os isolados de *Lecanicillium lecanii* CCMA-1138, CCMA-1139, CCMA-1140, CCMA-1142, CCMA-1143 e CCMA-1144.38
- Figura 8: Sensibilidade dos conídios de *Lecanicillium lecanii* (CCMA 1143) à radiação UV-B, em diversos estádios de germinação.....41
- Figura 9: Efeito da radiação UV-B sobre a área abaixo da curva de progresso do antagonismo (AACPA) de *Lecanicillium lecanii*, isolado CCMA 1143, sobre lesões de ferrugem do cafeeiro. A) radiação de $6,57 \text{ KJ m}^{-2}$ e B) $13,14 \text{ KJ m}^{-2}$, respectivamente. Os dados representam a média de 200 discos de folhas de café.42

SENSIBILIDADE DE *Lecanicillium lecanii*, AGENTE DE BIOCONTROLE DE *Hemileia vastatrix*, À RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA-B

Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas) -
Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Autor: JOSÉ ABRAHÃO HADDAD GALVÃO

Orientador: Prof. Dr. WAGNER BETTIOL

RESUMO

A ferrugem é a principal doença do cafeeiro e o seu agente causal, *Hemileia vastatrix*, é parasitado de forma natural por *Lecanicillium lecanii*, indicando potencial desse fungo para controle biológico. Um dos fatores que comprometem a eficiência de bioagentes é a radiação ultravioleta-B (UV-B). A incidência dessa radiação na superfície da Terra aumentou com a diminuição da camada de ozônio estratosférico, podendo afetar os processos naturais de controle de doenças de plantas e o uso de bioagentes. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da radiação UV-B sobre *L. lecanii*. Dessa forma, foram realizados experimentos para selecionar os isolados mais tolerantes à radiação UV-B; avaliar a sensibilidade do bioagente à radiação UV-B em diversos estádios da germinação de conídios; estabelecer a curva de sobrevivência dos isolados expostos à radiação; avaliar a interação da radiação UV-B com temperaturas e concentrações de CO₂ do ar; e avaliar o efeito da radiação UV-B no estabelecimento de *Lecanicillium* em pústulas de ferrugem. Os experimentos foram realizados em câmara de radiação, com irradiância média de 1.700 mW m⁻² no interior, sendo os conídios expostos à radiação em placas de Petri contendo BDA e em discos de folhas de cafeeiro contidos em bandejas plásticas. Os estudos evidenciaram a efetividade biológica da radiação UV-B sobre os conídios de *Lecanicillium*, tendo como respostas a inativação dos propágulos, o atraso no processo de germinação de conídios e o incremento ou a diminuição do desenvolvimento do bioagente. Diferentes níveis de sensibilidade da germinação de conídios, entre os isolados de *Lecanicillium* testados, foram observados quando expostos a radiação UV-B. Os isolados mais tolerantes foram os coletados em maiores altitudes. Houve

diferença entre as DL₅₀ dos isolados, com destaque para o isolado CCMA-1143, com a dose 6,57 kJ m⁻² de radiação UV-B, contrastando com o isolado CCMA-1142, com DL₅₀ 1,54 kJ m⁻². Os conídios foram mais sensíveis à radiação quando expostos após 3 a 9 h de incubação para germinação. Não houve interação entre os efeitos da radiação UV-B e temperaturas, tampouco com concentrações de CO₂ do ar. A exposição à radiação UV-B de discos de folhas lesionados com ferrugem e inoculados com o isolado CCMA-1143 aumentou a área abaixo da curva de progresso do antagonismo (AACPA), quando comparado ao tratamento sem a radiação. Entretanto, considerando o inóculo natural de *Lecanicillium* existente nas lesões, a radiação UV-B reduziu a AACPA.

Palavras-chave: Mudanças climáticas, UV-B, *Verticillium lecanii*, *Hemileia vastatrix*, Biocontrole.

THE SENSIBILITY OF *Lecanicillium lecanii*, BIOCONTROL AGENT OF *Hemileia vastatrix*, TO ULTRAVIOLET-B RADIATION

Dissertation (Master's Degree in Agronomy/Plants Protection) - Agronomic Science College, Universidade Estadual Paulista.

Author: JOSÉ ABRAHÃO HADDAD GALVÃO

Adviser: Prof. Dr. WAGNER BETTIOL

SUMMARY

Coffee leaf rust is the most important disease of the coffee crop, and its causing agent, *Hemileia vastatrix*, has the *Lecanicillium lecanii* as its natural parasite, which indicates the potential of this fungus as a biocontrol agent. One of the factors that endanger the efficiency of the bioagents is the ultraviolet-B radiation (UV-B). The incidence of this radiation on the surface of Earth has increased with the reduction of the stratospheric ozone layer, which can affect the natural process of control of plant diseases and the use of bioagents. The aim of this study was to evaluate the effect of UV-B radiation on *L. lecanii*. Thus, bioassays were held in order to select the isolates which are more tolerant to UV-B radiation; evaluate the sensibility of the bioagent to the UV-B radiation in several stages of the conidia germination; establish the survival curve of the isolate which exposed to the radiation; evaluate the interaction of the UV-B radiation with different temperature and concentrations of CO₂ in the air; and evaluate the effect of the UV-B radiation in the establishment of *Lecanicillium* in lesions of coffee leaf rust. The bioassays were held in a chamber with average irradiation of 1,700 mW m⁻², and the conidia were exposed to the radiation in Petri dish with BDA and on coffee leaves discs kept in plastic trays. The UV-B radiation was effective on *Lecanicillium* conidia germination, and the response was the reduction and the delay in germination of conidia, resulting in increment or reduction of the development of the bioagent. Different levels of sensibility were found in the conidia germination, among the isolates of *Lecanicillium* studies, which were observed when exposed to the UV-B radiation. The most tolerant isolates were those collected in higher altitudes. There was a difference among the

DL₅₀ of the isolates, specially the isolate CCMA-1143, with the dose 6.57 kJ m⁻² of UV-B radiation, when compared to the isolate CCMA-1142, with DL₅₀ 1.54 kJ m⁻². The conidia were more sensible to radiation when exposed after 3 to 9 hours of incubation for germination. There was no interaction between UV-B radiation, temperatures and concentrations of CO₂ in the air in conidia germination. The area under antagonism progress curve (AUAPC) increased in lesion of coffee leaf rust inoculated with *Lecanicillium* CCMA-1143 isolate exposed to UV-B radiation, when compared to the treatment in discs of leaves without radiation. However, the UV-B radiation reduced the AUAPC in lesion with natural population of *Lecanicillium*.

Key words: Climate changes, UV-B, *Verticillium lecanii*, *Hemileia vastatrix*, Biocontrol.

1. INTRODUÇÃO

As atividades humanas têm alterado as concentrações de gases da atmosfera causando mudanças no clima do planeta (IPCC, 2007). Em consequência, as previsões para um futuro próximo indicam para alterações nas temperaturas do ar, aumento nas concentrações de dióxido de carbono (CO₂) atmosférico, metano (CH₄) e outros gases (IPCC, 2007) e aumento da radiação ultravioleta (UV) incidente na superfície da Terra (McKENZIE et al., 2007). Essa última, decorrente da redução da camada de ozônio (O₃) estratosférico (QUAITE et al., 1992; GODIN-BEEKMANN, 2010). As radiações UV-B (290-315 nm) e UV-A (315-400 nm) que atingem a superfície da Terra são biologicamente ativas (MANDRONICH et al., 1998), podendo ser nocivas a diversos seres vivos, inclusive ao homem (VAN DER LEUN et al., 2003), a patógenos, vetores e hospedeiros, afetando os ecossistemas e a agricultura (CALDWELL et al., 2003). A exposição de esporos de fungos à radiação UV-B pode danificar essas estruturas nas fases de desenvolvimento e infecção de plantas (RAVIV, 2004). Nessas, a radiação UV pode causar alterações morfológicas criando um microclima favorável às infecções por microrganismos. As doenças de plantas têm grande importância na agricultura, por causar perdas na produtividade e custos no manejo (AGRIOS, 2004). Portanto, é relevante conhecer os prováveis impactos das mudanças no clima sobre a ocorrência de doenças de plantas, pois permitirá a elaboração de estratégias de controle (GHINI et al., 2007). Paul (2000) discute que, apesar de pouca probabilidade de que as doenças de plantas sejam grandemente afetadas por essas mudanças, pouco se conhece sobre

os mecanismos pelos quais a radiação UV-B afeta as interações patógeno-hospedeiro, e poucos são os patossistemas estudados.

A tecnologia usada na agricultura para a proteção de plantas requer uso intensivo de agrotóxicos. Entretanto, a sociedade mostra preocupação com o impacto dessa agricultura na saúde e no ambiente, e busca por soluções para a redução do uso desses insumos (BETTIOL, 2008). Uma das alternativas viáveis é o controle biológico, que propõe o aproveitamento dos agentes de biocontrole no manejo de doenças de plantas.

A radiação solar é um dos fatores ambientais que interferem no estabelecimento desses bioagentes no hospedeiro (BRAGA et al., 2001a; MORANDI et al., 2006), e, na perspectiva de aumento da incidência dessa radiação na superfície da Terra, deve-se buscar agentes de biocontrole para doenças de culturas importantes, como a do café, tolerantes a essa mudança (RANGEL, 2005).

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café, com uma área plantada de 2,3 milhões de hectares e cerca de 5,7 bilhões de pés. São, cerca de, 287 mil produtores em 15 Estados, gerando cerca de 8,5 milhões de empregos na cadeia produtiva. Em 2011, a produção nacional foi de 43,5 milhões de sacas (CONAB, 2012). O cafeeiro é uma planta perene de clima tropical pertencente ao gênero *Coffea*, com duas espécies de maior importância econômica: *C. arabica*, respondendo por 74,5% da produção, e *C. canephora* (ZAMBOLIM et al., 2005; CONAB, 2012). É exigente em condições adequadas de umidade e temperatura, luz e a radiação solar, que influenciam, em maior ou menor intensidade, o desenvolvimento, intensidade e severidade de doenças (VALE et al., 2000; CARVALHO et al., 2002). A principal doença do cafeeiro é a ferrugem, causada por *Hemileia vastatrix*, responsável por prejuízos de até 50% em todas as regiões produtoras (GARÇON, 2004; ZAMBOLIM et al., 2005). O uso de cultivares resistentes é o método de controle mais eficiente (SERA et al., 2007; BRITO et al., 2010). No entanto, a maioria das variedades plantadas de café é suscetível à doença, e o seu controle é baseado na aplicação de fungicidas (MAFFIA et al., 2009). Com a intensificação das restrições ao uso desses produtos, Haddad et al. (2009), sugerem o controle biológico da ferrugem do cafeeiro como uma alternativa.

As primeiras constatações de controle biológico da ferrugem do cafeeiro foram por observações de estruturas brancas de *Lecanicillium lecanii* (sin. *Verticillium lecanii*, *Verticillium hemileiae*), nas pústulas em folhas do cafeeiro (SHAW,

1988; CARRION, 2002). A ação entomopatogênica e micoparasítica de *L. lecanii* é confirmada por Jackson et al. (2012), em estudos com *Coccus viridis* e *Hemileia vastatrix*, os quais observaram o papel regulatório desse antagonista na ocorrência da doença. A efetividade de *L. lecanii* em parasitar insetos, fitopatógenos e nematoides evidencia seu potencial como agente de biocontrole (VERHAAR et al. 1997; BENHAMOU et al., 2000; GOETTEL, 2008;).

Considerando os possíveis impactos da mudança climática na agricultura, a importância da cafeicultura para o país, a necessidade de manejo da principal doença da cultura e a importância de *Lecanicillium* no controle natural da doença, esse trabalho foi desenvolvido, visando: estabelecer metodologias para avaliar o efeito da radiação UV-B sobre a germinação de conídios de *Lecanicillium*; selecionar isolados de *Lecanicillium*, de diversas regiões produtoras de café, tolerantes à radiação UV-B; avaliar a sensibilidade dos conídios do bioagente em diversos estádios de desenvolvimento; avaliar o efeito da ação conjunta de radiação UV-B e temperaturas sobre a germinação de conídios de *Lecanicillium*; avaliar a ação conjunta de radiação UV-B e concentrações de CO₂ do ar sobre a germinação de conídios de *Lecanicillium*; avaliar o efeito da radiação UV-B no estabelecimento de *Lecanicillium* em pústulas de ferrugem em discos de folhas de cafeeiro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Entre os fatores ambientais que contribuem para a mudança climática estão o aumento nas concentrações de dióxido de carbono (CO_2) atmosférico, de metano (CH_4), de ozônio (O_3) e outros gases, com conseqüente aumento da temperatura e da radiação ultravioleta (UV) na superfície da Terra (IPCC, 2007). Essa última, decorrente da redução da camada de ozônio estratosférico (GODIN-BEEKMANN, 2010). Essa mudança poderá trazer riscos aos ecossistemas (JOHNSON, 2003) e à agricultura (ORTH et al., 1990; FINCKH et al., 1995).

O conhecimento dos prováveis impactos dessas mudanças sobre a ocorrência de doenças de plantas é de grande importância para o setor agrícola, pois permite a elaboração de estratégias de controle (GHINI et al., 2007).

O ozônio é um gás com alta capacidade de absorção de radiações solares, e está presente na estratosfera, camada que envolve a Terra numa faixa entre 12 e 50 km acima do nível do mar, servindo como filtro seletivo à faixa ultravioleta (UV) que atinge a superfície do planeta, garantindo a estabilidade dos ecossistemas (WU et al., 2009; GODIN-BEEKMANN, 2010).

A luz solar que atinge a superfície da Terra inclui a radiação de luz visível (400-800 nm), radiação infravermelha (> 800 nm) e parte da radiação ultravioleta, que é composta da radiação UV-B (280-320 nm) e UV-A (320-400 nm). Parte da radiação UV-B é filtrada pela camada de ozônio e outros gases atmosféricos, sendo que apenas ondas de

comprimento acima de 290 nanômetros chegam à superfície do planeta. Dentre a radiação ultravioleta que incide sobre a superfície terrestre, 95% correspondem à radiação UV-A e 5% à radiação UV-B (SCHIAVE et al., 2009; PAUL, 2000).

Nas últimas décadas esse filtro formado pela camada de ozônio vem sendo danificado devido às atividades antrópicas, com perda estimada em 4 a 6% entre 1979 e 1999 em países do hemisfério norte (HOLLANDSWORTH et al., 1995) e a diminuição do ozônio estratosférico irá aumentar a intensidade da radiação UV-B que atinge a biosfera (QUAITE et al., 1992).

O principal causador da destruição do ozônio são os gases do grupo dos clorofluorcarbonos (CFC) liberados na atmosfera pelo homem em processos industriais (IPCC, 2007). Esses gases são transportados por correntes de ar acumulando-se, principalmente, nos polos onde produzem as falhas conhecidas como “buracos na camada de ozônio” (JOHNSON, 2003; TANHUA et al., 2009). Esse efeito é mais acentuado no inverno, quando temperaturas estratosféricas caem abaixo do limiar crítico, provocando uma substancial perda na camada de ozônio (VAN DER LEUN et al., 2003).

Outros fatores que influenciam a irradiância localmente no planeta são: os relacionados com aspectos geográficos, como estação do ano, altitude, latitude, ângulo em relação ao sol e fotoperíodo; e os ambientais como a nebulosidade e poluentes no ar. Esses fatores definem fortemente a radiação incidente (MANDRONICH et al., 1998). Cabrera et al. (1995) observaram maiores irradiâncias com o aumento da altitude, enquanto que Piazena (1996) verificou menores irradiâncias em maiores latitudes.

Nesse cenário, onde se prevê uma maior exposição dos seres vivos à radiação UV-B e o conhecimento de sua associação com problemas de saúde humana e ao ambiente, foi elaborado, em 1987, dentro do Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento (PNUD), o Protocolo de Montreal em que países signatários, como o Brasil, assumiram o compromisso de promover mudanças nos processos industriais com ênfase na substituição de tecnologias livres de substâncias que destroem a camada de ozônio, como o CFC e o brometo de metila utilizado na agricultura. Mesmo com as mudanças efetivadas e a redução na emissão desses gases controlada, pesquisadores afirmam que a restituição dos níveis de ozônio aos níveis anteriores à década de 1980 somente ocorrerá a partir da metade do

século 21 (HADER et al., 2003), sujeitando os habitantes do planeta aos efeitos nocivos dessa perda por mais algumas décadas (McKENZIE et al., 2007; GODIN-BEEKMANN, 2010).

Na pesquisa biológica, a questão da redução na camada de ozônio e alterações no espectro da radiação UV, demandou estudos sobre efeitos biológicos mais realistas e foram desenvolvidas funções de ponderação, como a “Biological Spectral Weighting Function (BSWF)” (FLINT; CALDWELL, 2003). A BSWF tem papel importante de estimar as implicações da redução do ozônio estratosférico. Elas são usadas para calcular o aumento da radiação UV biologicamente efetivas devido à redução da camada ozônio (“radiation amplification factor” – RAF). A BSWF é também utilizada para estimar gradientes latitudinais da radiação solar UV e comparar a radiação solar UV com a radiação UV de lâmpadas e filtros utilizados em experimentos (FLINT; CALDWELL, 2003).

Flint et al. (2009) verificam que o resultado da radiação UV de lâmpadas comumente usadas em experimentos com intensificação da radiação UV-B não é similar à radiação UV-B solar, e propõe que a avaliação da diminuição da camada de ozônio com uso de uma BSWF adequada ao sistema biológico estudado. Quate et al. (1992) desenvolveram um espectro de dano no DNA de plantas, que é também, usado em fungos.

2.1 Efeitos da radiação UV-B em doenças de plantas

As radiações UV-B e UV-A, provenientes do sol, exercem seus efeitos de maneiras distintas. A UV-B é absorvida diretamente por ácidos nucleicos, lipídios e proteínas, o que leva à formação de vários tipos de fotoprodutos que comprometem a estrutura e a função dessas macromoléculas (KUNZ et al., 2006). O DNA é um dos principais cromóforos da radiação UV-B. A absorção dessa radiação pelas bases nitrogenadas do DNA causa a excitação de elétrons que migram para níveis de energia superiores e mais instáveis, formando diversos fotoprodutos como: dímeros de pirimidinas do tipo ciclobutano 6-4, fotoprodutos, isômero Dewar, hidratos de pirimidina e glicóis de timina. A radiação UV-B é também fortemente absorvida por aminoácidos aromáticos, como a tirosina, o triptofano e a fenilalanina. As formas reativas dos resíduos desses aminoácidos podem sofrer autólise,

ocorrendo a desnaturação e a perda da função biológica de enzimas e de proteínas (GERHARDT et al., 1999). A radiação UV-A, por outro lado, exerce toxicidade de maneira indireta através de formas reativas de oxigênio (ROS) como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxila (OH) e o oxigênio singlete (1O_2). Estes processos são dependentes do oxigênio.

Nas plantas a radiação UV, geralmente, causa alterações morfológicas como a diminuição do tamanho do número de folhas, no aumento da ramificação ou no perfilhamento (TERAMURA et al., 1994; ROZEMA et al., 1997). Essas modificações na arquitetura da planta poderão alterar a temperatura, umidade e luminosidade formando um microclima favorável à infecção das plantas por fungos e bactérias. Entretanto, exposição de plantas a radiação UV estimula a expressão de genes importantes para resistência a patógenos de plantas (KUNZ et al., 2006). A radiação UV-B é conhecida por agir na via metabólica de componentes que se assemelham com aqueles de defesa das plantas a patógenos. Estes componentes incluem formas reativas de oxigênio (ROS), óxido nítrico, cálcio, ácido jasmônico, ácido salicílico, etileno e produção de flavonoides e fenilpropanoides (MAZZA et al., 2000). Desta forma, plantas que recebem maior irradiação UV poderão ter os mecanismos de resistência ao ataque de patógenos afetados. Outras alterações fisiológicas nas plantas causadas pela radiação UV incluem alteração do teor de proteínas solúveis e lipídeos das membranas, da estrutura e das propriedades químicas da superfície foliar, incluindo ceras (PAUL, 2000), promove também a maturidade e senescência das plantas (MANNING; TIEDEMANN, 1995). A inibição da fotossíntese devido ao aumento da radiação UV-B também poderia resultar na redução de carboidratos solúveis o que favoreceriam a redução de infecção por patógenos (MANNING; TIEDEMANN, 1995).

Os danos causados pela radiação UV-B nessas biomoléculas, podem resultar em acelerada degradação (CALDWELL et al., 1998; CALDWELL; FLINT, 1994), levando a perdas na produção em importantes culturas por redução na capacidade fotossintética (ZHAO, 2004), alteração nos estádios fenológicos e diminuição na reprodução (MOHAMMED; TARPLEY, 2010). A redução do crescimento devido ao consumo energético na produção de compostos de defesa (JAAKOLA; HOHTOLA, 2010) e na proteção do DNA contra os efeitos dessa radiação (ROZEMA et al., 1997) é outro efeito da radiação UV-B em plantas. O estresse da planta causado pela radiação UV-B pode torná-la mais resistente a

estresses de origem abiótica (BALLARÉ, 2003). Antognoni et al. (2007) verificaram aumento na produção de flavonoides em *Passiflora quadrangularis* sob efeito do aumento da radiação UV-B. Esses efeitos, no entanto, podem variar com a espécie da planta, cultivar e local do plantio (PAUL et al., 2003), também podem ter efeitos regionais distintos: plantas de regiões altas do hemisfério sul apresentam maior adaptabilidade à radiação UV-B do que plantas de regiões baixas do hemisfério norte (TURUNEN e LATOLA, 2005).

A tolerância de fungos à radiação UV-B é uma característica com grande amplitude em plasticidade fenotípica (BRAGA et al., 2001a; RANGEL et al., 2005; RANGEL et al., 2006; RANGEL et al., 2004). Esta plasticidade fenotípica é uma resposta ao meio ao qual a estrutura do fungo foi produzida. Quanto a restrição a determinadas fontes de carbono, Rangel et al. (2006) verificaram que os conídios de *Metarhizium anisopliae* foram mais tolerantes à radiação UV-B quando produzidos em meio rico em carbono. Quanto ao local de origem, os resultados de Braga et al. (2001a), com *Metarhizium anisopliae* obtidos em diversos continentes, mostram que se pode esperar que populações de patógenos de plantas provenientes de diferentes localidades, em consequência da variabilidade genotípica e fenotípica, apresentem diferenças com relação à tolerância da radiação UV-B.

A redistribuição geográfica de patógenos, vetores e hospedeiros é um fator importante a ser considerado no cenário de mudança climática no que se refere às atividades agrícolas, pois poderão ser afetados pela radiação ultravioleta (COAKLEY et al., 1999).

Alvarado-Gutierrez et al. (2008), trabalhando com feijão (*Phaseolus vulgaris*), avaliaram o efeito de doses da radiação UV-B e como resposta obtiveram plantas com maior tolerância a *Colletotrichum lindemuthianum*. Resultados semelhantes foram obtidos por Kunz et al. (2006), usando plantas de *Arabidopsis thaliana* e o patógeno biotrófico *Hyaloperenospora parasitica*. Esses resultados demonstram que a radiação UV-B pode agir na expressão de genes de resistência das plantas. No entanto, Orth (1990) chegou a resultados divergentes estudando o desenvolvimento de doenças em cultivares de pepino (*Cucumis sativum* L.) expostos diariamente a doses de UV-B. Esse autor concluiu que os efeitos da radiação variaram dependendo da cultivar, duração da exposição, concentração do inóculo e idade da planta.

A radiação UV-B tem ação nas relações patógeno-hospedeiro e pode interferir em aspectos fitossanitários e na agricultura (RAVIV et al., 2004). Os mesmos autores afirmam que os efeitos dessa radiação podem ocorrer diretamente nos patógenos, nos vários estádios de desenvolvimento, como na germinação, no tubo germinativo, no crescimento das hifas e na esporulação, ou indiretamente por respostas da planta à exposição com modificações bioquímicas, ativação de mecanismos de defesa, indução de resistência, alteração do espessamento das folhas e cutícula.

A tecnologia usada na agricultura para a proteção de plantas, visando uma produção que atenda a uma demanda crescente por alimentos, requer uso intensivo de agrotóxicos. Dentro dessa previsão, é necessário considerar as possíveis alterações na eficácia dos princípios ativos usados no controle das doenças e o impacto causado nesse novo ambiente (BOXALL et al., 2009). Entretanto, a sociedade mostra preocupação com impactos negativos dessa agricultura na saúde e no ambiente e busca soluções para a redução do uso desses insumos (BETTIOL, 2008). Nesse sentido, uma das alternativas é o controle biológico, que propõe o aproveitamento dos agentes de biocontrole, tanto os naturais quanto o introduzidos, no manejo de doenças de plantas (MORANDI; BETTIOL, 2009). Entretanto, existem fatores que interferem no sucesso do uso desses microrganismos, e entre eles, a radiação solar (BRAGA et al., 2001; MORANDI et al., 2006). As radiações UV-B e UV-A podem provocar alterações genéticas e morfológicas nos agentes de biocontrole, ou ainda inativar os propágulos desses organismos resultando em ineficiência no controle (BRAGA et al., 2001b). Costa (2011) observou que a radiação UV-B reduziu a presença e o crescimento de *Clonostachys rosea*, em condições de campo, sob efeito da radiação UV-B.

Na perspectiva de alterações na incidência dessa radiação na superfície da Terra comprometer a eficiência em programas de controle biológico, deve-se buscar isolados de agentes de biocontrole que possam tolerar essas mudanças (RANGEL et al., 2005). Existe número considerável de trabalhos sobre os efeitos da UV-B sobre entomopatógenos usados na agricultura. Para *Metarhizium anisopliae*, fungo amplamente usado no controle biológico de pragas em cultura da cana-de-açúcar, Braga et al. (2001b) analisaram os efeitos na germinação de conídios expostos à radiação. Nessa mesma espécie foram estudados os danos causados no DNA (BRAGA et al., 2002), as implicações do local de origem dos isolados (BRAGA et al., 2001c) e a influência da coloração dos conídios na sobrevivência do

fungo (BRAGA et al., 2006). Também Rangel et al. (2006) avaliaram os efeitos de fontes de açúcar sobre o desenvolvimento desse bioagente.

A radiação UV-B tem importância na mesma grandeza para os agentes de controle de fitopatógenos. Em trabalhos com simulação de UV-B, Costa (2011) avaliou a tolerância de isolados de *Clonostachys rosea* e *Trichoderma*, a doses dessa radiação e o efeito na germinação dos conídios nos diferentes estádios subsequentes de desenvolvimento e verificou ação deletéria da radiação nesses agentes de biocontrole e sensibilidade diferenciada a cada fase do processo de germinação dos conídios. Algumas espécies do gênero *Trichoderma* são amplamente estudadas e reconhecidas como agentes de controle de doenças de plantas, com uma estimativa de aplicação em mais de 1,2 milhões de hectares no Brasil em 2010 (BETTIOL, 2011). Costa (2011) avaliou o efeito de doses de UV-B em isolados desse fungo para selecionar os mais tolerantes à radiação.

Espécies de fungos do gênero *Lecanicillium* têm atividade como entomopatógenos e são usados em bioinseticidas comerciais (MICHEREFF FILHO et al., 2009), sendo alguns isolados efetivos contra nematoides e fungos fitopatogênicos (GOETTEL et al., 2008). A atividade hiperparasítica de *Lecanicillium* em ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*) foi demonstrada por Mahfud et al. (2006) e por Vandermeer et al. (2009) e no oídio do morangueiro (*Sphaerotheca macularis*) por Miller et al. (2004) e como antagonista do bolor verde dos citrus (*Penicillium digitatum*) por Benhamou (2004). O potencial de *Lecanicillium psalliotae*, como agente de biocontrole do nematoides foi demonstrado por Gan et al. (2007) em estudos com *Meloidogyne incognita*. Esses resultados de sucesso confirmam o potencial do uso de agentes de biocontrole na agricultura. Entretanto, o exíguo número de trabalhos sobre os efeitos dos aspectos ambientais sobre esses organismos mostram a necessidade de maiores estudos.

2.2 Ferrugem do cafeeiro

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café, com uma área plantada de 2,3 milhões de ha e cerca de 5,7 bilhões de pés. São, cerca de, 287 mil

produtores em 15 Estados. Em 2011, a produção nacional foi de 43,5 milhões de sacas de 60 kg. Para a safra de 2012 estima-se um aumento entre 12 e 20% devido à bienalidade da cultura. Para o país, representa a entrada de divisas na ordem de US\$ 8,7 bilhões e a geração de mais de oito milhões de empregos na cadeia produtiva. Os principais destinos das exportações brasileiras de café verde foram Estados Unidos, Alemanha, Itália e Japão; de café solúvel foram Estados Unidos, Rússia, Ucrânia e Japão; e de café torrado e moído foram Estados Unidos, Itália, Japão e Argentina (CONAB, 2012).

Um dos fatores responsáveis por essa posição é a utilização de cultivares altamente produtivas e adaptadas às mais distintas condições edafoclimáticas. O país possui uma variedade de climas, solos, relevos, altitudes e latitudes que permitem a produção em diversas regiões e uma ampla gama de tipos e qualidades de cafés (ASSAD et al., 2004; CONAB, 2012).

O cafeeiro é uma planta perene de clima tropical, pertence à família das Rubiaceas e ao gênero *Coffea*. Reúne mais de 100 espécies descritas e as duas espécies de maior importância econômica são a *Coffea arabica* e a *C. canephora* (ZAMBOLIM et al., 2005). No Brasil, predomina a espécie *C. arabica* respondendo por 74,5% da produção (CONAB, 2012). A temperatura ideal para *C. arabica* é entre 16 °C e 24 °C e fora desses limites são inadequadas para o cultivo. O cafeeiro necessita de umidade disponível no solo durante a floração até o enchimento dos grãos (BOLDINI, 2001). Outros fatores climáticos importantes na cultura do café são a umidade, a luz e a radiação solar que influenciam em maior ou menor intensidade o desenvolvimento, intensidade e severidade de doenças (VALE et al., 2000; CARVALHO et al., 2002). Lin (2007) verificou que cafeeiros cultivados em áreas sombreadas, são menos prejudicados por estresses hídricos e altas temperaturas, podendo ser uma das alternativas para minimizar os efeitos das mudanças do clima.

Considerando-se os prognósticos de mudanças no clima para os próximos 100 anos e mantidas as características genéticas e fisiológicas das atuais variedades, a produção nessas áreas poderá ser reduzida e a cafeicultura deverá ser deslocada para regiões dentro dos limites climáticos aceitáveis para a cultura (ASSAD et al., 2004).

O cafeeiro é suscetível a uma série de doenças causadas por vírus, bactérias, nematoides e, em maior número e importância, os fungos. Entre esses, destaca-se

Hemileia vastatrix, causador da ferrugem, responsável por prejuízos em todas as regiões produtoras (ZAMBOLIM et al., 2005).

Os primeiros registros da ferrugem alaranjada do cafeeiro foram no Ceilão nos anos de 1860, quando o agente causal foi descrito por Berkeley como *Hemileia vastatrix* Berk. Em 1970 esse fungo foi constatado no estado da Bahia e, contrariamente a outros países onde a doença expandia lentamente, no Brasil ocorreu rapidamente chegando em poucos anos ao estado de São Paulo. E hoje, é um problema a ser controlado nos países produtores de café (ZAMBOLIM et al., 2005). Os sintomas da doença são observados primeiramente como manchas cloróticas translúcidas na face abaxial das folhas com 1 a 3 mm de diâmetro, evoluindo para 1 a 2 cm em poucos dias. Nesses locais aparecem massas pulverulentas de cor alaranjada, compostas por uredinósporos do patógeno. Nas projeções das lesões, na face superior da folha, as áreas são de coloração amarelo pálido. Com o aumento de tamanho, a área central da lesão torna-se necrótica, com menor esporulação, e os esporos produzidos podem ser esbranquiçados. A cor alaranjada, característica dos esporos, pode ser mascarada pela presença do hiperparasita *Verticillium hemileiae* Bour. *Hemileia vastatrix*, pertencente à família Pucciniaceae, ordem Uredinales e classe Basidiomycetes, é um fungo biotrófico, com o ciclo de vida incompleto e a fonte de inóculo são os uredinósporos produzidos nas pústulas de folhas (AGRIOS, 2004; ZAMBOLIM et al., 2005). Esses esporos podem sobreviver por até seis semanas em período seco e a disseminação ocorre pela ação do vento, na execução de tratos culturais, no contato com insetos e outros animais, mas principalmente, pelas águas. Desse modo, o desenvolvimento da doença no campo coincide com o período de chuvas (ZAMBOLIM et al., 2005). A ferrugem alaranjada das folhas é a mais importante doença do cafeeiro e pode causar perdas de até 50% da produção (ZAMBOLIM et al., 1997) O controle da doença é hoje baseado na aplicação de fungicidas (MAFFIA et al., 2009). Entretanto, o uso intensivo de agrotóxicos tem acarretado problemas ambientais (MORANDI; BETTIOL, 2009). E, ainda que esses fungicidas supram a necessidade de controle da doença, o uso de cultivares resistentes é o método mais eficiente e ecologicamente correto (SERA et al., 2007; BRITO et al., 2010). Porém, considerando-se que a maioria das variedades plantadas de café é suscetível à doença, que a variabilidade fisiológica e genética do patógeno reduz a durabilidade da resistência e que há restrições ao uso de fungicidas, Haddad et al. (2009) sugerem o controle biológico da ferrugem do cafeeiro.

Entre as estratégias desse método, para o uso eficiente de antagonistas, deve se considerar, além do modo de ação, da ecologia, da fisiologia e da indução de defesa do hospedeiro, a resistência a estresses ambientais (BETTIOL, 1991).

2.3 Controle biológico e *Lecanicillium lecanii*

Entre os diversos conceitos para controle biológico de doença de plantas, o mais abrangente e aceito pela comunidade científica é o formulado por Cook; Baker (1983, p. 254) que o descrevem como “A redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno, realizada por, ou através de um ou mais organismos que não o homem”. Em uma visão mais prática, o controle biológico de doenças de plantas pode ser conceituado como sendo o controle de um microrganismo por meio de outro microrganismo. O termo antagonista designa os organismos com potencial para interferir nos processos vitais do patógeno (MORANDI et al., 2009).

A efetividade do controle biológico é relacionada com o estabelecimento e manutenção dos organismos no hospedeiro. Entre os principais fatores abióticos que podem afetar a viabilidade de agentes microbianos estão a temperatura e a exposição à radiação solar (WARRIOR et al., 2002). Assim, pode-se considerar que a mudança climática tem um potencial para o impacto no estabelecimento de agentes de biocontrole (GOLDSON, 2006) no ambiente, bem como na sua eficiência. Bailey et al. (1996) observaram que *Bacillus thuringiensis*, aplicado em folhas de videira expostas à radiação solar, teve sobrevivência inferior a 50% após 24 h da aplicação, e quando aplicado em folhas sombreadas a sobrevivência foi superior a 60% depois de 48 h. Esse aspecto é importante também para estabelecer o melhor período para aplicação de um agente de biocontrole, bem como indica a necessidade de desenvolver formulações desses organismos com proteção à radiação UV-B. Reddy et al. (2008) aplicaram 10g/L do protetor solar Tinopal como adjuvante contra os efeitos da radiação solar em conídios de *Beauveria bassiana* e não encontraram resultados adversos.

Os mais importantes mecanismos de controle biológico são: competição, parasitismo, predação, hipovirulência e indução de defesa (BETTIOL, 1991).

Ghini (2005) constata que as possíveis modificações nos microrganismos presentes na filosfera, as alterações na fisiologia e nos mecanismos de resistência das plantas, ainda não estão suficientemente esclarecidos. Coakley et al. (1999) concluíram que o efeito das mudanças climáticas quanto ao manejo de doenças de plantas será menos impactante para a agricultura do que as adequações necessárias nos padrões de uso de terras agrícolas. E que os patossistemas deverão ser revistos para os modelos climáticos previstos e por regiões específicas. O patossistema cafeeiro-*Hemileia vastatrix* (ferrugem) poderá sofrer com as alterações na incidência da radiação UV-B e são necessários estudos prévios sobre os efeitos dessa mudança no clima sobre a cafeicultura.

Na literatura encontra-se grande número de trabalhos sobre o biocontrole da ferrugem do cafeeiro (MAFFIA et al., 2009). Entre os bioagentes estudados, e Shaw (1988) e Carrion et al. (2002) observam a presença de estruturas brancas de *Lecanicillium lecanii* (Zimmerman) Zare e Gams (sin. *Verticillium lecanii*, *Verticillium hemileiae*), nas pústulas em folhas do cafeeiro. A atividade de *L. lecanii* se estende para outros fitopatógenos, como *Sphaerotheca fuliginea*, agente causal do oídio das cucurbitáceas (VERHAAR et al., 1997), e *Penicillium digitatum*, causador do bolor verde dos citros (BENHAMOU et al., 2000). Em plântulas de aveia, Leinhos e Buchenauer (1992) demonstraram que várias espécies do gênero *Verticillium* podem penetrar e colonizar pústulas de *Puccinia coronata*.

A ação entomopatogênica e micoparasítica de *L. lecanii* foi constatada por Jackson et al. (2012) em estudos com *Coccus viridis* (cochonilha verde do cafeeiro) e *Hemileia vastatrix*. Os autores observaram a dinâmica e intensa rede de interações entre múltiplas espécies confirmando o papel regulatório do fungo na ocorrência da doença. A efetividade de *L. lecanii* contra insetos pragas, doenças de plantas e nematoides demonstra potencial como agente de controle biológico. Entretanto, ainda não existem produtos desenvolvidos para fitopatógenos (VERHAAR et al., 1997; BENHAMOU et al., 2000; GOETTEL, 2008).

Até recentemente, o gênero *Verticillium* englobou uma grande variedade de espécies tendo como hospedeiros artrópodes, nematoides de plantas e fungos (ZARE et al., 2008). Esse gênero foi redefinido a partir de resultados do sequenciamento de rDNA, alocando os patógenos de insetos dentro do novo gênero *Lecanicillium* (ZARE et al.,

2008), onde estão incluídos *L. attenuatum*, *L. lecanii*, *L. longisporum*, *L. muscarium* e *L. nodulosum*, anteriormente classificados como *Verticillium lecanii*. Nessa revisão, foram mantidas as nomenclaturas usadas pelos autores. E no decorrer dos trabalhos, será usado o binômio *Lecanicillium lecanii*, nomenclatura mais frequente na literatura, para esse antagonista de *Hemileia vastatrix*.

Em folhas de cafeeiro, as hifas de *V. lecanii* entrelaçam as estruturas das pústulas de ferrugem formando uma massa branca e cotonosa. Desenvolve-se em meio BDA a uma taxa de 29 a 33 mm após dez dias de cultivo. Os conidióforos são cristalinos sob microscópio estereoscópico. Fiálides com 9-40 x 0,8-2,4 µm, mais largas na base e estreitas no ápice, com 4 a 10 grupos de 4 a 8, são dispostas em espiral produzindo no ápice conídios de elipsoidais a cilíndricos, e dimensões entre 4-5,6 x 1,6-2,4 µm (CARRION, 2002). Vega e Claro (2007) descreveram espécies entomopatogênicas do gênero *Lecanillium* com características semelhantes, em colônias incubadas a 21-24 °C em meio BDA. Observaram que os conídios não são formados em cadeia e não formam clamidósporos. Acrescentam que espécies desse gênero diferem morfologicamente. Afirmam ainda que a eficácia desses microrganismos como agentes de controle biológico é condicionada à temperatura e umidade.

Face ao exposto, conclui-se que um dos fatores limitantes do uso de agentes de biocontrole é o estabelecimento em campo devido à radiação solar. Braga et al. (2001a) demonstraram os efeitos danosos da radiação UV em entomopatógenos como *Metarhizium* e *Beauveria*. Costa (2011) observou que a radiação UV-B reduziu a presença e o crescimento do bioagente *C. rosea* em discos de folhas de morangueiro. No entanto, *L. lecanii* e *Acremonium album* são usados em controle de pragas em diferentes condições de UV ambientais (HALL, 1980).

Isolados de *L. lecanii* podem expressar diferentes sensibilidades durante o processo de germinação de conídios sob efeito da UV-B, o que permite a seleção dos mais tolerantes a maiores doses dessa radiação. Essa sensibilidade pode ser modificada quando associada a outros fatores com previsão de alteração na mudança do clima, como concentração de CO₂ do ar e temperatura. Os experimentos componentes desse trabalho propõem conhecer o comportamento de *L. lecanii* no novo ambiente.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Isolados de *Lecanicillium*

No presente estudo foram utilizados 10 isolados de *Lecanicillium*, sendo um cedido da coleção de microrganismos da Universidade Federal de Lavras (UFLA) pelo Dr. Ludwig Pfenning, um da coleção da Universidade Federal de Viçosa (UFV) cedido pelo Dr. Luiz Antonio Maffia, um isolado do bioinseticida Vertirril® WP (Itaforte Ltda.) e sete obtidos de lesões de ferrugem em folhas de cafeeiro que apresentavam o crescimento desse antagonista, coletadas em diferentes regiões produtoras do estado de São Paulo. Desses isolados, sete foram depositados na coleção de microrganismos da Embrapa Meio Ambiente que utiliza a sigla CCMA como prefixo para codificação sequencial adotada pela empresa. Para os demais foram mantidas as identificações do coletor (Tabela 1). O isolamento diretamente das lesões foi realizado no mesmo dia da coleta das folhas, por extração de porções superficiais do micélio, característico de *L. lecanii*, presentes nas lesões de ferrugem, com alça de platina flambada. O plaqueamento foi em meio BDA contendo 1 g/L de sulfato de estreptomicina. Após incubação por dez dias em BOD, a 22 ± 1 °C e fotoperíodo de 12 h, foi avaliada a de germinação de conídios, e posterior repicagem, multiplicação e preservação dos isolados.

Tabela 1: Origem dos isolados de *Lecanicillium* avaliados quanto à sensibilidade à radiação UV-B.

Isolado	Cultura de origem	Local de origem	Data
CCMA-1144	Não informado	Vertirril®	Não informado
CCMA-1140	Não informado	UFLA	Não informado
CCMA-1139	Não informado	UFV	Não informado
OTC-01	Café	Jaguariúna SP	Março/2011
OTC-02	Café	Jaguariúna SP	Março/2011
CCMA-1142	Café	Jaguariúna SP	Março/2011
CCMA-1138	Café	Jaguariúna SP	Março/2011
CCMA-1141	Café	Pedreira SP	Março/2011
CCMA-1143	Café	Serra Negra SP	Março/2011
SGI-01	Café	Jaguariúna SP	Março/2011

3.2. Multiplicação e preservação de *Lecanicillium*

Os isolados de *Lecanicillium* foram cultivados em placas de Petri descartáveis de 5,0 x 1,0 cm contendo 8 mL de meio de cultura com de batata-dextrose-ágar (BDA) (Acumedia Manufacturers, Michigan), acrescido de 1 g/L de sulfato de estreptomicina (Sigma Chemical Co., China). As placas foram mantidas em BOD a 22 ± 1 °C por 7 a 10 dias, com fotoperíodo de 12 h quando atingiram plena esporulação. Esses limites coincidem com os usados por Monteiro et al. (2004) em estudos com esse fungo. Nessa fase, parte da cultura foi repicada para novas placas para uso nos experimentos e parte foi preservada pelo método Castellani em água esterilizada.

3.3. Preparo das suspensões de conídios utilizadas nos experimentos

No preparo das suspensões foram usadas as placas conforme descrito anteriormente, com 7 a 10 dias de incubação. Essas placas receberam 8 mL de água destilada

esterilizada mais Tween 80 (0,01% v/v) para extração superficial da massa de hifas e conídios, com alça de platina. A suspensão obtida foi transferida para tubo de ensaio e agitado por 20 segundos em agitador orbital. Com a desagregação do material, a suspensão foi filtrada em tripla camada de gaze autoclavado que, retendo as hifas e detritos, resultou na suspensão de conídios para uso nos estudos de germinação. A concentração de conídios foi determinada em câmara de Neubauer e a suspensão foi calibrada para 1×10^5 conídios/mL por ser a mais adequada para esses ensaios, com base em testes preliminares.

3.4. Germinação de conídios de *Lecanicillium*

Nos estudos sobre germinação, as suspensões de conídios de *Lecanicillium* foram preparadas conforme descrição anterior, transferidas alíquotas para o centro das placas com o meio de cultura e distribuídas por toda a superfície com alça de Drigalsky. Imediatamente, os conídios foram expostos à radiação UV-B e a incubação nas condições definidas para cada experimento. Ao final dos tempos de incubação foram aplicadas duas gotas de azul de lactofenol por placa, sobre o meio de cultura, para interromper o desenvolvimento do fungo, possibilitando a contagem de conídios germinados. A observação dos conídios foi diretamente na placa sob microscópio estereoscópico, com ampliação de 250 vezes (Figura 1 A; B; C). Foi seguida a metodologia descrita por Braga et al. (2002) considerando germinado o conídio com tubo germinativo com comprimento superior ao seu maior diâmetro. E o tempo adequado de incubação foi o que as hifas ainda não se sobrepuseram, impossibilitando a visualização individual e a contagem. Foram observados 300 conídios por placa e contados os germinados.

A sensibilidade dos isolados foi medida pela avaliação da germinação relativa dos conídios que foi calculada utilizando a equação: GERMINAÇÃO RELATIVA = $(Gv/Gt) \times 100$; onde Gv é o número de conídios germinados em cada replicata dos tratamentos com diferentes variáveis e Gt é o número de conídios germinados nas testemunhas.

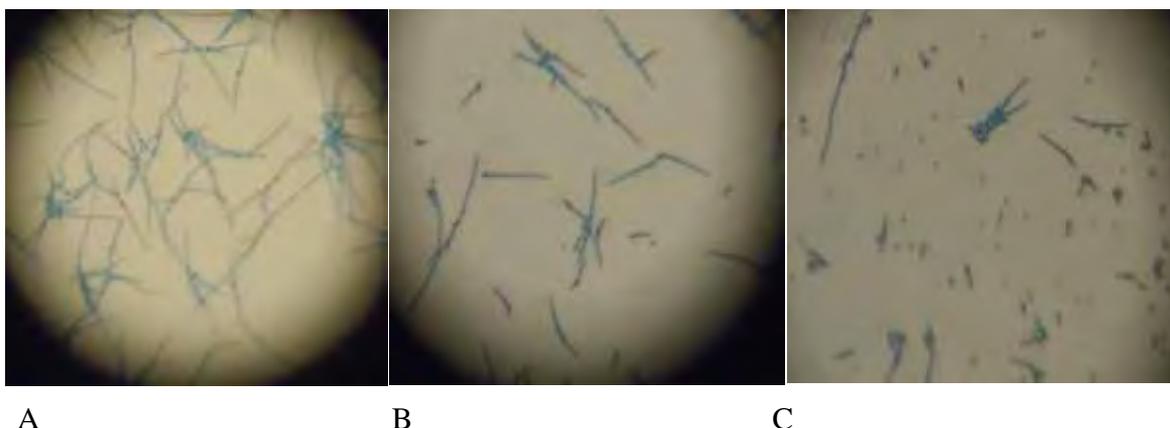
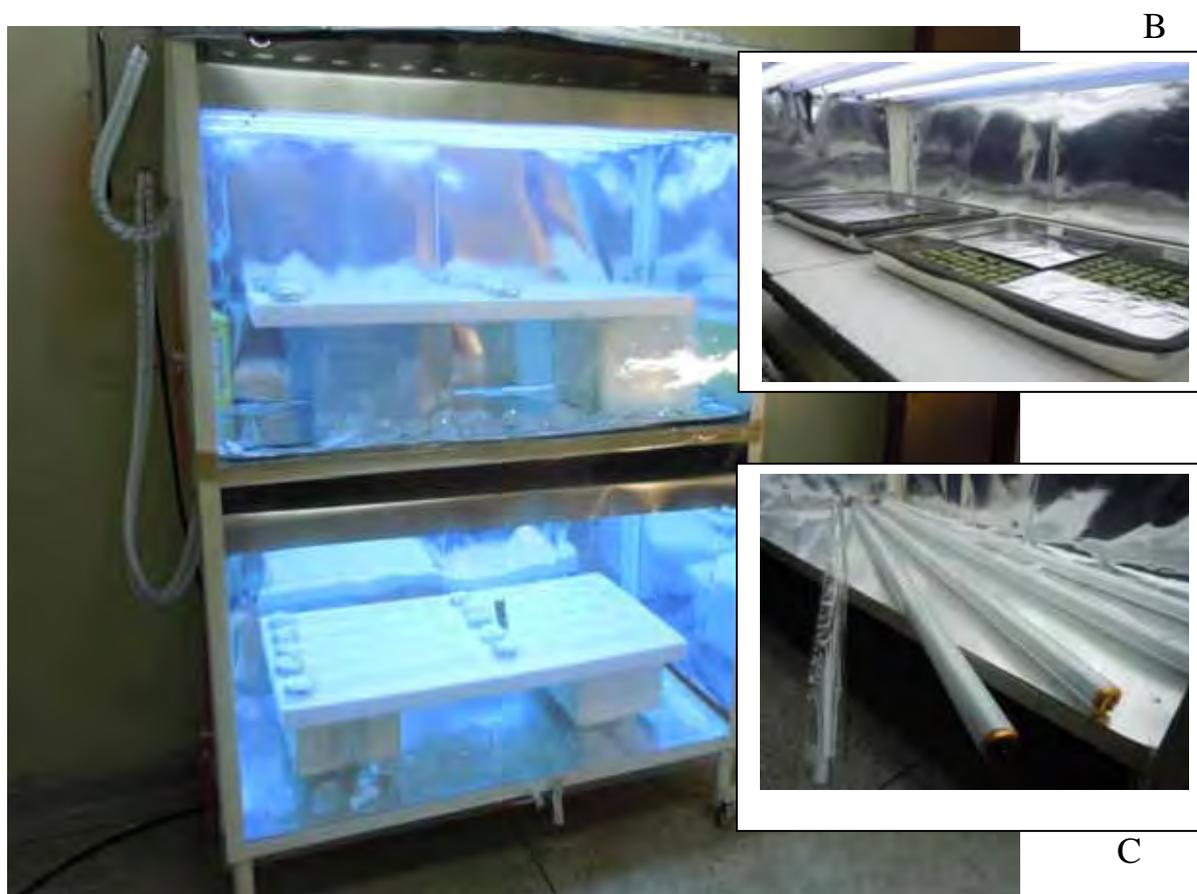


Figura 1: Efeito da radiação UV-B na germinação de *Lecanicillium lecani*. Conídios observados em microscópio estereoscópico com aumento de 250 vezes: A=99%; B=80%; C=30% germinados.

3.5. Câmara de simulação de radiação UV-B

Duas câmaras de radiação UV-B com a base de 1,2 x 0,5 m e altura de 0,6 m foram construídas em uma estante metálica (Figura 2A). Na parte interna superior foram instalados soquetes para quatro lâmpadas fluorescentes UV-B 313EL (Q-lab Cleveland, OH) e quatro lâmpadas fluorescentes luz branca, essas últimas, usadas para facilitar as atividades durante os experimentos (Figura 2B). As lâmpadas UV usadas nos experimentos foram envolvidas com uma folha de acetato de celulose de 0,13 mm de espessura (Málaga, SP, Brasil). Esse filtro permite a passagem da radiação UV-B na faixa 290–400 nm e restringe as radiações UV-C e espectros entre 280 e 290 nm, simulando a radiação solar incidente na Terra. Durante a execução dos experimentos esses filtros sofreram desgaste e foram trocados a cada três horas de uso para evitar a perda de qualidade da radiação UV-B incidente nos materiais em estudo (Figura 2C). A irradiância nas câmaras foi calculada com o auxílio de um espectrorradiômetro (Ocean Optics modelo USB2000 + rad) com medições em uma superfície plana a 33 cm de distância das lâmpadas, com 50 pontos equidistantes de dez centímetros em uma área útil de 100 × 50 cm.



A

Figura 2: Câmaras de radiação UV-B utilizadas em todos os estudos. Nessa ilustração, observa-se placas de Petri com meio de cultura onde os conídios estão expostos à radiação a 33 cm de distância das lâmpadas (A), Irradiação de conídios de *Lecanicillium* em discos de folha de café onde se observa retângulos de papel alumínio protegendo os discos dos tratamentos sem exposição à radiação (B) e troca do filtro de acetato de celulose das lâmpadas (C).

A irradiância no interior das câmaras foi calculada segundo o método de Quaité, Sutherland e Sutherland (1992), chegando-se à média de 1.700 mW m^{-2} , com uma energia de, aproximadamente, $6,18 \text{ kJ m}^{-2}/\text{hora}$ (Figura 3). Para estabilização da radiação, as lâmpadas foram ligadas 20 minutos antes do início dos trabalhos, e durante o tempo de exposição as placas foram rotacionadas periodicamente para equalizar as doses de radiação UV-B recebidas pelos microrganismos.

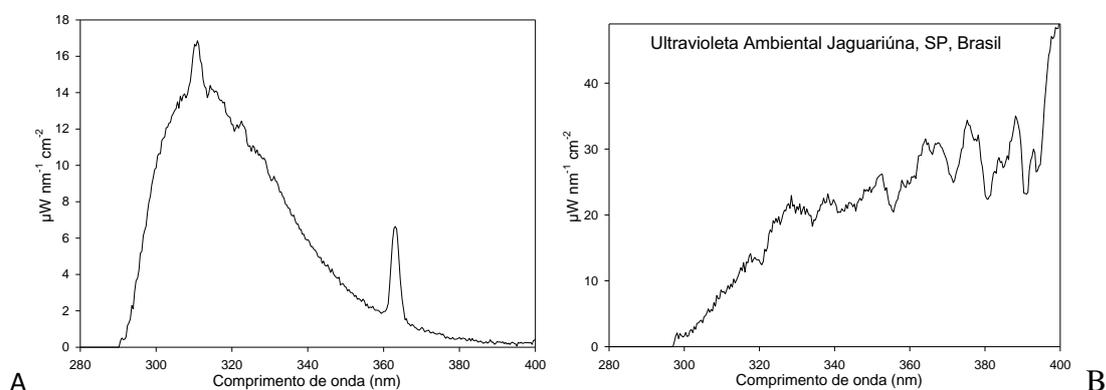


Figura 3: Irradiâncias medidas com o espectroradiômetro: A) Irradiância média no interior da câmara de UV-B; B) Maior radiação ultravioleta registrada no período do ensaio realizado ao meio dia sobre dia sem nuvens.

3.6. Efeito de distâncias das lâmpadas emissoras de radiação UV-B e tempos de incubação na germinação de conídios de *Lecanicillium*

O objetivo desse estudo foi estabelecer o melhor arranjo entre as variáveis: dose de radiação por distanciamento das lâmpadas e tempo de incubação de um isolado de *Lecanicillium*. Os resultados foram os limites de distâncias e um período de incubação que permitissem observar, em microscópio estereoscópico, os efeitos da radiação sobre a germinação dos conídios. O isolado usado foi o do produto comercial Vertirril[®] e os conídios foram expostos à radiação por 2 h em câmara de simulação de radiação. Os tratamentos foram: distância dos conídios às lâmpadas de 18, 33 e 48 cm e tempos de incubação de 12, 24 e 36 h, em BOD a 22 ± 1 °C no escuro. De uma suspensão de conídios na concentração de $1 \times 10^5/\text{mL}$, alíquotas de 30 μl foram transferidas para placas de Petri com BDA+estreptomicina. As placas foram levadas abertas para exposição dos conídios, em câmara de radiação nas distâncias de 18, 33 e 48 cm das lâmpadas emissoras de UV-B (Figura 4). Ao final do tempo de exposição, as placas foram levadas tampadas para BOD a 22 ± 1 °C. Ao atingir cada tempo de incubação, foi aplicado azul de lactofenol nas placas correspondentes aos tratamentos para interromper o desenvolvimento do fungo. A avaliação

foi feita pela observação de 300 conídios por placa e contagem de germinados. O ensaio foi repetido três vezes com duas placas réplicas.

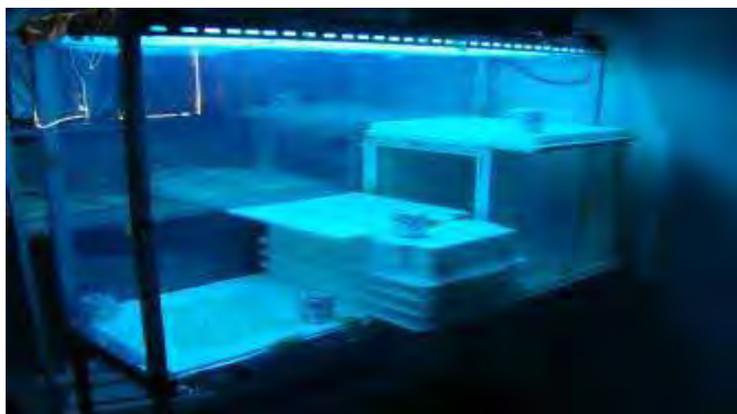


Figura 4: Irradiação de conídios de *Lecanicillium* em meio de cultura, com as placas de Petri expostas à radiação em três distâncias das lâmpadas UV-B.

3.7 Efeito da associação do tempo de exposição à radiação UV-B e do período de incubação na germinação de conídios de *Lecanicillium*.

O objetivo desse estudo foi estabelecer o melhor arranjo entre doses de radiação UV-B, usando diferentes tempos de exposição dos conídios à radiação e um período de incubação, que permitissem observar, em microscópio estereoscópico, os efeitos dessa radiação sobre a germinação dos conídios de *Lecanicillium*, do produto Vertirril®. Os tratamentos foram os tempos de exposição à radiação UV-B: 0 15; 30; 60; 90 e 120 minutos em câmara de radiação (Figura 5) e tempos de incubação de 12; 16; 20; 24 e 36 h a partir do plaqueamento, em BOD a 22 ± 1 °C, no escuro. Foi preparada uma suspensão de conídios na concentração de 1×10^5 /mL e alíquotas de 30 μ l foram transferidas para placas de Petri com BDA+ sulfato de estreptomicina. As placas foram levadas abertas para a câmara, para exposição dos conídios à radiação a uma distância de 31 cm das lâmpadas emissoras de UV-B. A cada tempo de radiação completado, as placas correspondentes a esses tratamentos foram

protegidas da radiação com papel alumínio e mantidas no local. Ao final do último tempo de exposição, as placas foram levadas fechadas para BOD. Ao atingir cada tempo de incubação, foi aplicado azul de lactofenol para interromper o desenvolvimento do fungo. A avaliação foi feita pela observação de 300 conídios por placa e contagem dos germinados. O ensaio foi repetido três vezes com duas placas réplicas.



Figura 5: Irradiação de *Lecanicillium* em meio de cultura. Observa-se papel alumínio sobre placas de Petri protegendo os conídios da radiação UV-B, colocados quando completado o tempo de exposição estabelecido para cada tratamento.

3.8 Efeito de doses de radiação UV-B na germinação de conídios de 10 isolados de *Lecanicillium*.

Para conhecer a sensibilidade na germinação de conídios de *Lecanicillium* e selecionar os mais tolerantes à radiação UV-B foram testados 10 isolados do antagonista sob efeito de 3 doses da radiação. Nos experimentos foram preparadas suspensões de conídios dos 10 isolados (Tabela 1), na concentração 1×10^5 , e transferidas alíquotas de 30 μ l para placas de Petri com meio de cultura BDA + sulfato de estreptomicina. As placas

foram colocadas abertas na câmara de simulação, para exposição dos conídios à radiação, a uma distância de 31 cm das lâmpadas. Os tratamentos foram: exposição de conídios dos 10 isolados a doses de radiação UV-B de 0; 4,12 e 6, 18 KJ m⁻², correspondentes aos tempos de 0; 40 e 60 minutos na câmara de simulação de radiação. Nos tempos zero e 40 minutos, as placas desses tratamentos foram protegidas da radiação com papel alumínio e permaneceram no local até o último tratamento. Completado o tempo do último tratamento, todas as placas foram levadas fechadas para BOD a 22 ± 1 °C, no escuro, por 20 horas a partir do plaqueamento. Ao atingir o tempo de incubação correspondente foi aplicado azul de lactofenol para interromper o desenvolvimento do fungo. A avaliação foi por observação de 300 conídios por placa e contagem de germinados. O experimento foi repetido três vezes com duas placas réplicas.

3.9 Estabelecimento da curva de sobrevivência de isolados de *Lecanicillium* expostos à radiação UV-B.

O objetivo desse estudo foi estabelecer a curva de sobrevivência e a dose letal 50% (DL₅₀) de seis isolados de *Lecanicillium* expostos à radiação UV-B. Para tanto, os tratamentos foram a exposição dos conídios às doses de 0; 1,54; 3,09; 4,63; 6,18; 7,72 e 9,27 KJ m⁻², correspondentes aos tempos de exposição de 0 (testemunha), 15, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos, em câmara de radiação à distância de 31 cm das lâmpadas. Os isolados testados foram: CCMA-1138, CCMA-1139, CCMA-1140, CCMA-1142, CCMA-1143 e CCMA-1144. Alíquotas de 30 µl de suspensões de conídios dos isolados, na concentração 1x 10⁵, foram transferidas para placas de Petri com meio de cultura BDA + sulfato de estreptomicina. Essas placas foram levadas para a câmara de simulação e mantidas abertas para exposição dos conídios à radiação pelos tempos requeridos para cada tratamento. A cada tempo atingido, as placas correspondentes às repetições dos tratamentos foram protegidas da radiação com papel alumínio e permaneceram no local. Ao término do último tratamento, os antagonistas foram incubados por 20 horas em BOD, a 22 ± 1 °C, no escuro. Ao final do período de incubação foi aplicado azul de lactofenol para interromper o desenvolvimento do fungo. A avaliação foi por

observação de 300 conídios por placa e contagem de germinados. O experimento foi repetido três vezes com duas placas réplicas.

3.10 Sensibilidade dos conídios de *Lecanicillium* em diversos estádios de germinação à radiação UV-B.

O estudo teve por objetivo conhecer o efeito da radiação UV-B em diversos estádios durante as primeiras horas de germinação dos conídios. Para os testes foram observados os resultados de experimentos anteriores desse trabalho e foi selecionado o isolado CCMA-1143, por ser o mais tolerante à UV-B, e a dose $6,57 \text{ kJ m}^{-2}$ dessa radiação (64 minutos de exposição), correspondente à dose letal 50% (DL_{50}). Os tratamentos foram a exposição dos conídios à radiação em oito tempos de incubação após o plaqueamento. Alíquotas de 30 μl de suspensões de conídios do isolado, na concentração 1×10^5 , foram preparadas e transferidas para placas de Petri com BDA + sulfato de estreptomicina nos tempos 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 h antes da exposição à radiação. A cada tempo as placas preparadas foram levadas para incubação do antagonista em BOD a $22 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, no escuro. Após o último tempo, as placas foram levadas abertas para a câmara de simulação para exposição dos conídios à radiação por 64 minutos. Nos tratamentos testemunha (sem radiação), as placas foram protegidas com papel alumínio. Completado o tempo de exposição à radiação, as placas retornaram fechadas para incubação do antagonista por mais 20 h em BOD a $22 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Ao completar esse período foi aplicado azul de lactofenol para interromper o desenvolvimento do fungo. A avaliação foi feita pela observação de 300 conídios por placa e contagem de germinados. O ensaio foi repetido três vezes com duas placas como réplicas.

3.11 Efeito da associação de radiação UV-B e concentração de CO_2 do ar na germinação de conídios de *Lecanicillium*.

O objetivo desse estudo foi conhecer a ação conjunta da radiação UV-B e da concentração de dióxido de carbono (CO₂) do ar na germinação de conídios de *Lecanicillium*. Baseado nos resultados dos experimentos anteriores foi selecionado o isolado CCMA-1143, por ser o mais tolerante à radiação UV-B. A dose utilizada foi 6,57 kJ m⁻² (64 minutos de exposição), correspondente à DL₅₀. Alíquotas de 30 µl de suspensão de conídios na concentração de 1 x 10⁵/mL foram transferidas para placas de Petri com BDA + sulfato de estreptomicina. Os tratamentos foram a incubação dos conídios por 20 h em 4 concentrações de CO₂ do ar, após a exposição à radiação UV-B. Para os tratamentos testemunha os conídios foram incubados nas mesmas condições, no entanto, foram protegidos da radiação com papel alumínio. As placas foram colocadas abertas na câmara de radiação e os conídios expostos à UV-B por 64 minutos (DL₅₀). Decorrido esse tempo, as placas foram levadas abertas para caixas com as seguintes concentrações de CO₂ do ar: 667 ± 112 ppm, 855 ± 273 ppm, 1245 ± 214 ppm e 615 ± 69 ppm, ficando incubadas por 20 horas. Essa etapa do experimento foi conduzida em uma sala climatizada com estrutura e instalações onde o CO₂ é injetado dentro de caixas plásticas, nas quantidades suficientes para atingir as concentrações desejadas. As caixas plásticas foram vedadas com lâmina de vidro, produzindo nos ambientes internos com as diferentes concentrações do gás. Ao atingir o tempo de incubação foi aplicado azul de lactofenol para interromper o desenvolvimento do fungo. A avaliação foi feita pela observação de 300 conídios por placa e contagem de germinados. O ensaio foi repetido duas vezes com cinco placas réplicas.

3.12 Efeito da associação de radiação UV-B e temperatura na germinação de conídios de *Lecanicillium*

O objetivo desse estudo foi conhecer a ação conjunta de radiação UV-B e temperatura na germinação de conídios de *Lecanicillium*. Baseado nos resultados dos experimentos anteriores foi selecionado o isolado CCMA-1143, por ser o mais tolerante a radiação UV-B. A dose utilizada foi 6,57 kJ m⁻² (64 minutos de exposição), correspondente à DL₅₀. Alíquotas de 30 µl de suspensão de conídios na concentração de 1 x 10⁵/mL foram

transferidas para placas de Petri com BDA + sulfato de estreptomicina. As placas foram levadas abertas para a câmara de simulação e os conídios receberam a dose de radiação em 64 minutos de exposição (DL₅₀). Completado o tempo de exposição, as placas foram levadas tampadas para incubação do antagonista. Os tratamentos foram a incubação dos conídios tratados com radiação UV-B em BOD por 20 h, no escuro, nas temperaturas de 19, 22, 25 e 28 ± 1 °C. Os tratamentos testemunhas (sem radiação) foram mantidos na câmara, protegidas com papel alumínio, com incubação nas mesmas condições. Ao atingir o tempo de incubação foi aplicado azul de lactofenol para interromper o desenvolvimento do fungo. A avaliação foi feita pela observação de 300 conídios por placa e contagem de germinados. O ensaio foi repetido duas vezes com cinco placas réplicas.

3.13 Efeito da radiação UV-B no estabelecimento de *Lecanicillium lecanii*, isolado CCMA 1143, em lesões de ferrugem do cafeeiro.

O objetivo desse experimento foi estudar o efeito da radiação UV-B no estabelecimento de *Lecanicillium* em lesões de ferrugem em folhas de cafeeiro. A metodologia utilizada foi a de discos de folhas descrita por Eskes (1982). Para os testes foram observados os resultados de experimentos anteriores desse trabalho e foi selecionado o isolado CCMA-1143, por ser o mais tolerante à radiação UV-B. Foram utilizadas duas doses da radiação: 6,57 KJ m⁻² (DL₅₀) e 13,14 KJ m⁻². Os tratamentos foram: (1) discos com lesão de ferrugem sem receber radiação UV-B; (2) discos com lesão de ferrugem e com exposição às duas doses de radiação UV-B; (3) discos com lesão de ferrugem e *Lecanicillium* inoculado, sem a radiação UV-B; (4) discos com lesão de ferrugem e *Lecanicillium* inoculado, com exposição às duas doses de radiação UV-B. Para a instalação do ensaio, foram coletadas folhas de cafeeiro com sintomas de ferrugem no estágio de esporulação. Com auxílio de furador de rolhas de 1,5 cm de diâmetro, foram sacados discos das áreas contendo as lesões. Os discos foram colocados com a superfície abaxial voltada para cima em placas de espuma com 1,0 cm de espessura, saturadas com água, contidas em caixas plásticas com dimensões 30,0 x 40,0 x 5,0 cm, tendo como tampas lâminas de vidro transparente que possibilitaram a continuidade da fotossíntese e

mantiveram alta a umidade relativa. Nos tratamentos com *Lecanicillium* foram aplicados, sobre os discos, $3 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ da suspensão de conídios do isolado na concentração de 10^7 /mL, com pulverizador manual. Após a aplicação da suspensão de conídios, as caixas com os discos e sem a cobertura de vidro foram levadas para a câmara de simulação de radiação UV-B a uma distância de 31 cm das lâmpadas. Nos tratamentos sem a radiação, os discos foram protegidos com folhas de papel alumínio. Decorridos os tempos de 64 e 128 minutos, correspondentes à DL_{50} para o isolado, e duas vezes essa dose, as bandejas foram novamente cobertas com as lâminas de vidro e levadas para sala de incubação na temperatura de 26 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas, por até sete dias. Foram feitas inspeções diárias até a observação dos primeiros sintomas de *Lecanicillium* sobre as lesões de ferrugem, quando foi realizada a primeira avaliação. Foram feitas mais duas avaliações, 24 e 48 h após a primeira. As variáveis consideradas nas avaliações foram o início do aparecimento de sintomas, porcentagem de discos com lesões atacadas e porcentagem da área das lesões colonizadas. Os tratamentos tiveram duas repetições com 50 discos cada (Figura 6). Com os resultados obtidos foi calculada a Área Abaixo da Curva de Progresso do Antagonismo (AACPA). O experimento foi repetido duas vezes.



Figura 6: Bandeja com discos de folhas de café com os 4 tratamentos do experimento.

3.14 Análise dos resultados

Na análise dos resultados foram utilizados os pacotes estatísticos SAS, Assistat e SigmaPlot. Dados de germinação de conídios e da intensidade de doença foram analisados por análise de variância (ANOVA) e os tratamentos comparados pelo teste de Tukey. Como os ensaios foram repetidos duas ou três vezes e apresentaram dados semelhantes, a análise foi realizada com o conjunto dos dados. Para análise os dados de porcentagem foram transformados em raiz $(x+0,5)^{-2}$.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito de distâncias das lâmpadas emissoras de radiação UV-B e tempos de incubação na germinação de conídios de *Lecanicillium*

A dose de radiação UV-B, em 120 minutos de exposição, à distância de 18 cm das lâmpadas UV, inibiu totalmente a germinação dos conídios do isolado CCMA-1144 de *Lecanicillium*, em todos os períodos de incubação. Houve resposta semelhante na germinação, quando os conídios foram expostos a 33 cm de distância e incubados por 12 e 24 h. Com 36 h de incubação o efeito dessa mesma dose de radiação foi o aumento na germinação. Na distância de 48 cm dos conídios às lâmpadas, a radiação UV-B causou aumento significativo da germinação de conídios nos tempos de incubação 24 e 36 h e inibição da germinação com 12 h de incubação (Tabela 2).

Tabela 2: Sensibilidade na germinação relativa (%) de conídios do isolado CCMA-1144 de *Lecanicillium lecanii* sob efeito de duas doses de radiação UV-B e três tempos de incubação.

Período de incubação	Distância das lâmpadas	
	33 cm	48 cm
12 h	0,11 bA	0,00 cA
24 h	6,00 bB	74,86 bA
36 h	39,98 aA	87,38 aA
CV (%)	37,45	

Médias seguidas da mesma letra (minúsculas-colunas e maiúsculas-linhas) não diferem entre si (Tukey ao nível de 5% de probabilidade). Na análise estatística foram usados os dados das seis repetições, correspondentes à soma das duas repetições dos três ensaios. Para análise os dados foram transformados em raiz $(x+0,5)^{-2}$.

4.2 Efeito da associação do tempo de exposição à radiação UV-B e do tempo de incubação na germinação de conídios de *Lecanicillium*

Os resultados dos testes com o isolado CCMA-1144, indicaram que nos tratamentos em que os conídios foram incubados por 12 h, houve inibição da germinação nos tratamentos com radiação em todos os tempos de exposição, diferindo do tratamento sem essa exposição que foi de 53,83% (tempo zero). A exposição por 120 minutos inibiu totalmente a germinação dos conídios em todos os tempos de incubação. As doses de radiação obtidas com os tempos 60 e 90 minutos de exposição reduziram a germinação dos conídios em todos os tempos de incubação. Nos tempos de exposição 0, 30 e 90 minutos, não houve diferença entre os tempos de incubação. Nos tempos 15 e 60 minutos de exposição, houve aumento da germinação com 36 h de incubação (Tabela 3).

Tabela 3: Germinação de conídios (%) do isolado CCMA-1144 de *Lecanicillium lecanii* expostos por seis tempos à radiação UV-B e incubação por cinco períodos após a radiação.

Tempo de exposição (min)	Tempo de incubação			
	Germinação (%)			
	16 horas	20 horas	24 horas	36 horas
T0	77,00 aA	80,16 aA	84,00 aA	99,66 aA
T15	50,83 aB	71,33 aAB	70,66 aAB	85,00 aA
T30	41,16 aA	44,50 aA	65,83 aA	62,71 abA
T60	0,66 bB	13,66 bAB	8,83 bB	39,10 bA
T90	04,83 bA	1,33 bA	1,66 bA	13,88 cA
CV (%)	31,33			

Médias seguidas da mesma letra (minúsculas-colunas e maiúsculas-linhas) não diferem entre si (Tukey ao nível de 5% de probabilidade). Na análise estatística foram usados os dados das seis repetições, correspondentes à soma das duas repetições dos três ensaios. Para análise os dados foram transformados em raiz $(x+0,5)^{-2}$ e não foram considerados o tempo de incubação 12 h e o tempo de exposição 120 minutos, devido à inibição total.

4.3 Efeito de doses de radiação UV-B na germinação de conídios de isolados de *Lecanicillium*

Os dados de germinação relativa dos conídios mostraram diferenças significativas entre os 10 isolados testados (Tabela 4). Os isolados mais tolerantes à radiação UV-B foram: CCMA-1138; CCMA-1143; CCMA-1141; CCMA-1140, seguido por CCMA-1139; SIM-1. Os isolados mais sensíveis à radiação foram: CCMA-1144; OTC-2; OTC-1; CCMA-1142. Houve diferença significativa na germinação dos conídios do conjunto de todos os isolados tratados com as doses 4,12 e 6,18 KJ m⁻² de radiação UV-B, sendo que a dose 6,18 KJ m⁻² causou maior redução na germinação (Tabela 4).

Tabela 4: Germinação relativa de conídios (%) de 10 isolados de *Lecanicillium lecanii* expostos a duas doses de radiação UV-B.

Isolado/Tratamento	Germinação (%)
CCMA-1144	36,80 c
OTC 1	56,30 bc
OTC 2	34,72 c
CCMA-1138	79,86 a
CCMA-1142	34,57 c
SGI-1	72,45 ab
CCMA-1143	81,28 a
CCMA-1141	81,50 a
CCMA1140	81,59 a
CCMA1139	68,66 ab
4,12 KJ m ⁻²	74,32 a
6,18 KJ m ⁻²	51,24 b
CV (%)	27,09

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si (Tukey ao nível de 5% de probabilidade). Na análise estatística foram usados os dados das seis repetições, correspondentes à soma das duas repetições dos três ensaios. Para análise os dados foram transformados em raiz $(x+0,5)^{-2}$.

4.4 Estabelecimento da curva de sobrevivência de isolados de *Lecanicillium* expostos à radiação UV-B

Houve diferenças nas curvas de sobrevivência à radiação UV-B entre os isolados de *Lecanicillium* CCMA-1142, CCMA-1138, CCMA-1139, CCMA-1140, CCMA-1144 e CCMA-1143. As DL_{50} dessa radiação, para os isolados, obtidas por regressão, foram: 1,54; 2,25; 2,46; 2,97; 3,49 e 6,57 kJ m⁻², respectivamente (Figura 7). O isolado CCMA-1143 foi, destacadamente, o mais tolerante à radiação UV-B, com DL_{50} 6,57 kJ m⁻², enquanto para os demais isolados a DL_{50} foi entre 1,54 e 3,49 kJ m⁻². Na análise estatística foram usados os dados das 6 repetições, correspondentes à soma das 2 repetições dos 3 ensaios.

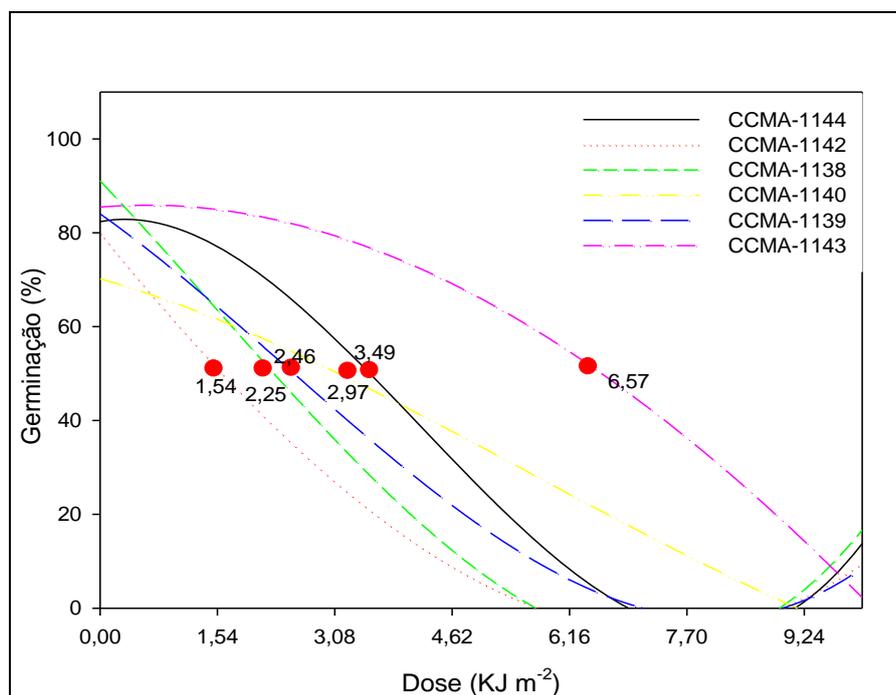


Figura 7: Curva de sobrevivência à radiação UV-B e DL₅₀ para os isolados de *Lecanicillium lecanii* CCMA-1138, CCMA-1139, CCMA-1140, CCMA-1142, CCMA-1143 e CCMA-1144.

4.5 Efeito da associação de radiação UV-B e temperatura na germinação de conídios de *Lecanicillium*

A dose de radiação usada nesse experimento foi de 6,57 KJ m⁻², correspondente à DL₅₀ para o isolado CCMA-1143, obtida por regressão, em experimento anterior, quando incubado à temperatura de 22 ± 1 °C. Nesse estudo, no tratamento com essa mesma temperatura, a germinação dos conídios foi de 57,16%. Essa maior porcentagem de germinação pode ter ocorrido por diferenças nos estádios de desenvolvimento do fungo e maturação dos conídios, no preparo das suspensões. Houve diferenças significativas entre os tratamentos com exposição dos conídios à radiação e conídios sem a radiação. No tratamento com incubação a 19 ± 1 °C houve drástica redução na germinação. Nos tratamentos com temperatura de incubação de 22 ± 1, 25 ± 1 e 28 ± 1 °C houve aumento na porcentagem de germinação de conídios, mas a diferença não foi significativa. Nos tratamentos em que os

conídios não receberam radiação UV-B, não houve diferenças significativas entre as temperaturas de incubação (Tabela 5).

Tabela 5: Efeito da radiação UV-B associada às temperaturas de incubação na sensibilidade da germinação de conídios do isolado CCMA-1143 de *Lecanicillium lecanii*.

Temperatura	Com radiação	Sem radiação
19 ± 1 °C	4,40 bB	82,63 aA
22 ± 1 °C	57,16 bA	88,03 aA
25 ± 1 °C	61,43 bA	87,80 aA
28 ± 1 °C	63,60 bA	88,13 aA
CV (%)	13,03	

Médias seguidas da mesma letra (minúsculas-colunas e maiúsculas-linhas) não diferem entre si (Tukey ao nível de 5% de probabilidade). Na análise estatística foram usados os dados das seis repetições, correspondentes à soma das duas repetições dos três ensaios. Para análise os dados foram transformados em raiz $(x+0,5)^{-2}$.

4.6 Efeito da associação de radiação UV-B e concentração de CO₂ do ar na germinação de conídios de *Lecanicillium*.

A germinação de conídios, expostos à radiação UV-B e incubados nas 4 concentrações de CO₂, foi entre 73,37 e 77,37%, não havendo diferença significativa entre os tratamentos. As germinações médias nesses tratamentos foram superiores a 73,25%, acima, portanto, dos 50% esperados para a dose de radiação UV-B recebida (Tabela 6). Possivelmente, esse resultado foi devido à temperatura de incubação (26 ± 2 °C) da sala climatizada usada no experimento. Em estudo anterior, com o mesmo isolado foi observado aumento da germinação com o aumento da temperatura de incubação de conídios expostos à mesma dose da radiação. No presente experimento, os conídios foram incubados em placas abertas para possibilitar o contato com o CO₂ do ar e esse fator pode ter colaborado para a maior porcentagem de germinação verificada. Houve diferença significativa entre os tratamentos com exposição dos conídios à radiação UV-B e os tratamentos sem a radiação.

Tabela 6: Efeito da radiação UV-B associada a quatro concentrações CO₂ do ar na sensibilidade de germinação de conídios do isolado CCMA-1143 de *Lecanicillium*.

CONCENTRAÇÃO DE CO ₂ (ppm)	GERMINAÇÃO (%)	
	COM RADIAÇÃO	SEM RADIAÇÃO
667	63,64 aB	84,8 aA
855	55,76 aB	86,83 aA
1245	63,47 aB	86,51 aA
615	58,42 aB	84,77 aA
CV (%)	10,74	

Médias seguidas da mesma letra (minúsculas-colunas e maiúsculas-linhas) não diferem entre si (Tukey ao nível de 5% de probabilidade). Na análise estatística foram usados os dados das seis repetições, correspondentes à soma das duas repetições dos três ensaios. Para análise os dados foram transformados em raiz $(x+0,5)^{-2}$.

4.7 Sensibilidade dos conídios de *Lecanicillium* em diversos estádios de germinação à radiação UV-B.

A germinação dos conídios de *Lecanicillium* dos tratamentos testemunha (não expostos à radiação UV-B) foi próxima a 100% em todos os períodos de incubação. Por outro lado, a germinação dos conídios irradiados imediatamente após o plaqueamento (tempo 0) foi cerca de 50%, conforme o esperado para o isolado CCMA-1143, exposto à dose 6,57 KJ m⁻². A incubação por 3 a 9 h, anteriores à irradiação, causou redução da germinação de conídios de *L. lecanii*. Possivelmente, nesse período os conídios iniciaram o processo de germinação, sendo mais sensível a radiação UV-B. Conídios de *Lecanicillium*, incubados por 6 h de incubação antes da irradiação, mostraram-se mais sensíveis, com praticamente 100% de inibição da germinação (Figura 8). Em testes preliminares, os conídios de *L. lecanii* CCMA-1143 germinaram após 12 h de incubação (dados não apresentados). No presente trabalho, após 12 ou mais horas de incubação anteriores à exposição à radiação UV-B, a maior parte dos conídios já estava germinada e não houve interferência do tratamento

sobre a germinação. No entanto, outros testes são necessários para avaliar o efeito da radiação UV-B sobre o crescimento micelial do agente de biocontrole.

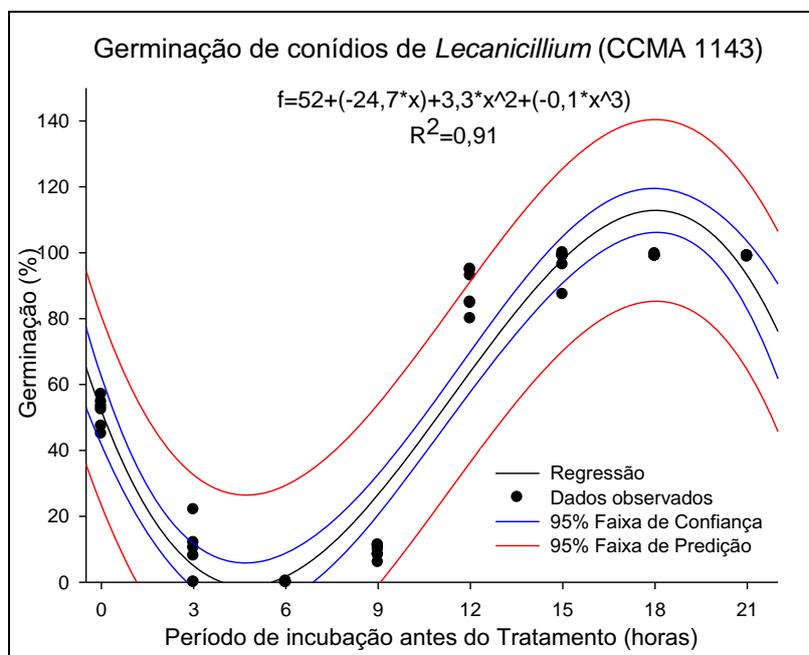


Figura 8: Sensibilidade dos conídios de *Lecanicillium lecanii* (CCMA 1143) à radiação UV-B, em diversos estádios de germinação.

4.8 Efeito da radiação UV-B no estabelecimento de *Lecanicillium lecanii*, isolado CCMA 1143, em lesões de ferrugem do cafeeiro.

As doses de radiação UV-B de $6,57 \text{ KJ m}^{-2}$ (DL50) e $13,14 \text{ KJ m}^{-2}$ diferiram significativamente entre os tratamentos com e sem inoculação de *Lecanicillium*, indicando baixa ocorrência natural do antagonista nas lesões de ferrugem, na ocasião da coleta das folhas. A observação dos primeiros sinais de *Lecanicillium* sobre as lesões de ferrugem foi em aproximadamente a 72 h de incubação, em todos os tratamentos. Nos tratamentos com inoculação de *Lecanicillium* houve um evidente estabelecimento do antagonista sobre as lesões de ferrugem. Nos tratamentos com inoculação de

Lecanicillium, com as duas doses de radiação UV-B, houve aumento significativo no estabelecimento desse agente de biocontrole (Figura 9).

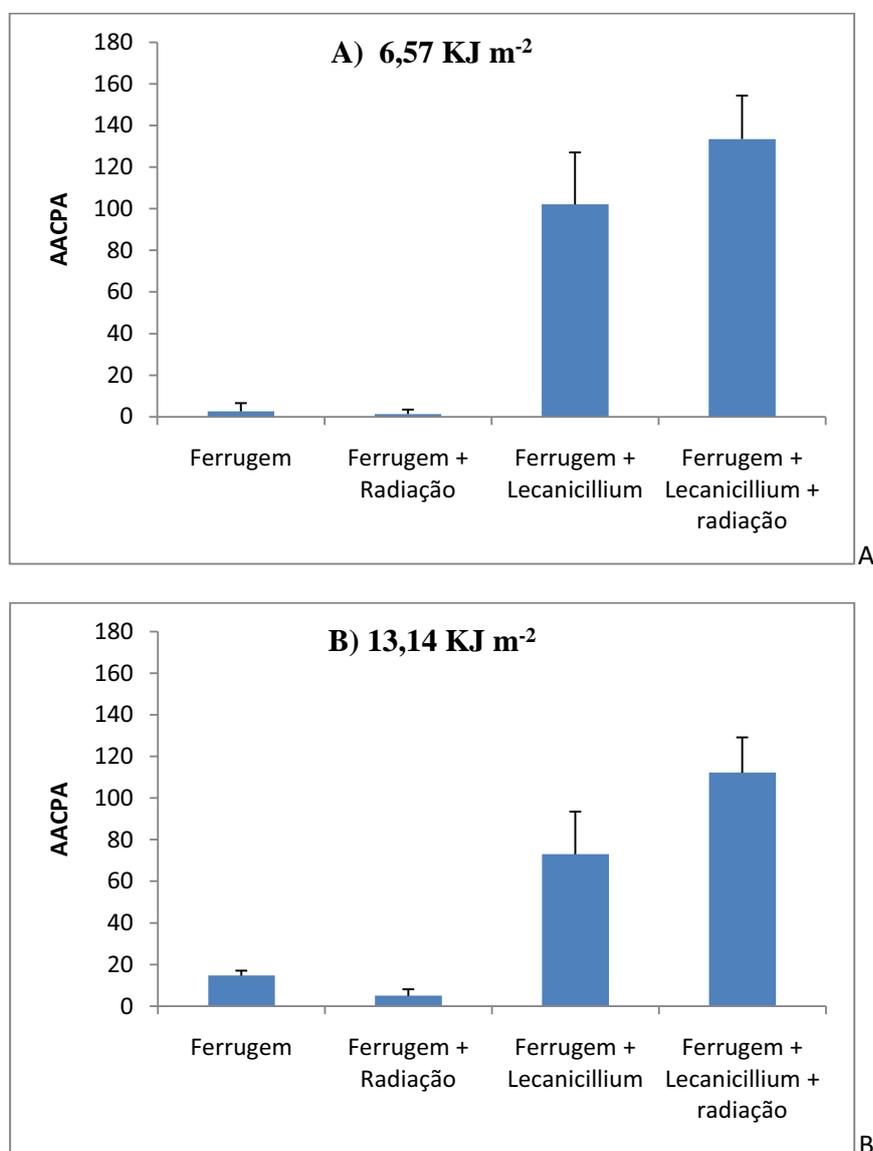


Figura 9: Efeito da radiação UV-B sobre a área abaixo da curva de progresso do antagonismo (AACPA) de *Lecanicillium lecanii*, isolado CCMA 1143, sobre lesões de ferrugem do cafeeiro. A) radiação de 6,57 KJ m⁻² e B) 13,14 KJ m⁻², respectivamente. Os dados representam a média de 200 discos de folhas de café.

5. DISCUSSÃO

Os efeitos danosos da radiação UV-B sobre fungos foram observados em *Metarhizium* (BRAGA et al., 2001b) e em *Verticillium lecanii* (BRAGA et al., 2002). Essa radiação é biologicamente ativa em plantas (JAAKOLA et al., 2010), bactérias e vírus (PAUL, 2003), afetando ecossistemas e as relações patógeno-hospedeiro (PAUL, 2000). As metodologias estabelecidas nos estudos e os resultados do presente trabalho mostraram variados efeitos da UV-B sobre isolados de *Lecanicillium* que poderão subsidiar novos estudos sobre esse potencial bioagente num cenário de mudança climática com previsão de aumento dessa radiação.

Dos 10 isolados de *Lecanicillium* usados nos experimentos (Tabela 1), três são de origem geográfica não informada (CCMA-1139; CCMA-1140 e CCMA-1144), e foram usados para comparação nos testes de sensibilidade de germinação de conídios. Os demais foram isolados de plantas dos municípios de Jaguariúna-SP (CCMA-1138; CCMA-1142; OTC-1; OTC-2 e SGI-01), Pedreira SP (CCMA-1141) e Serra Negra SP (CCMA-1143), com altitudes médias de 590, 900 e 1050 m, respectivamente. Conforme os resultados dos estudos de Cabrera et al. (1995) e Piazena (1996), que verificaram maiores intensidades de UV-B em regiões de maiores altitudes, esperava-se encontrar, entre esses isolados, diferentes tolerâncias a essa radiação, em razão de terem se adaptado às diferentes altitudes dos locais de coleta. Os isolados CCMA-1143 e CCMA-1141, coletados a 1.050 e 900 m de altitude, estão

entre os mais tolerantes à radiação (Tabela 4). Braga et al. (2001c) discutem a variada tolerância à radiação UV-B entre isolados de *Metharizium* de diferentes locais de coleta.

A câmara de radiação UV-B usada nos experimentos foi semelhante à descrita por Costa (2011), que verificou a inativação de conídios de *Clonostachys rosea* e *Trichoderma* spp. em poucas horas de exposição. A irradiância média interna, a 33 cm de distância das lâmpadas UV, foi 1.700 mW m^{-2} . Essa intensidade é aproximadamente duas vezes a verificada por Braga et al. (2002), 800 mW m^{-2} , em Logan, Utah, USA, situada a $41,5^\circ$ de latitude N e 1.500 m de altitude, e três vezes a irradiância em Jaguariúna SP, Brasil, $22,6^\circ$ de latitude S e 590 m de altitude, 651 mW m^{-2} verificada por Costa (2011).

Os resultados dos testes preliminares para estabelecer a metodologia para obter a dose de radiação UV-B e o período de incubação adequado para os estudos com *Lecanicillium* (Tabelas 2 e 3), evidenciaram os efeitos de redução da germinação e inativação dos conídios desse fungo. Resultados semelhantes foram verificados por Braga et al. (2002) em estudo com *Verticillium lecanii* e por Costa (2011) em trabalho com isolados de *Trichoderma* spp. e *C. rosea*.

Inicialmente os conídios foram expostos a três diferentes distâncias das lâmpadas UV-B, por 120 minutos e, posteriormente, incubados por três períodos distintos. Os dados apresentados na Tabela 2 mostram que para o isolado CCMA-1144 a dose de radiação recebida pelos conídios, expostos a 18 cm das lâmpadas UV, inativou esses propágulos, efeito observado até 36 h de incubação. No período de 12 h de incubação não houve germinação dos conídios. Esse tempo pode ter sido insuficiente para o início das observações. Quando expostos à radiação a 33 cm das lâmpadas UV-B, foi verificado aumento da germinação com 36 h de incubação. Na distância de 48 cm, esse aumento ocorreu com 24 h. A radiação pode ter causado danos no DNA e outras macromoléculas (KUNZ et al., 2006), levando à perda da função biológica de enzimas e de proteínas (GERHARDT et al., 1999) e atrasos em função da recuperação dos danos causados (BRAGA et al., 2002).

No experimento onde os conídios foram colocados à distância única de 33 cm das lâmpadas UV e expostos por 6 tempos à radiação e em seguida incubados por cinco períodos, verifica-se na Tabela 3 que nos tratamentos em que os conídios não foram submetidos à radiação UV-B ocorreu aumento da germinação após 24 h, comparado a 12 h de incubação; no período de incubação 12 h houve diferença somente entre os tratamentos com

radiação e sem radiação; os tempos de exposição 15 e 30 minutos de exposição atrasaram a germinação no período de 12 h; a incubação dos conídios por um maior período proporcionou um aumento da germinação destes conídios; em 15 e 30 minutos de exposição, a incubação por 16 h foi suficiente para aumentar a germinação; para 60 minutos de exposição foram necessárias 36 h de incubação para aumentar a germinação dos conídios, enquanto que para 90 e 120 minutos os períodos de incubação não foram suficientes para ocasionar o aumento (Tabela 3). Braga et al. (2002), em estudo sobre sensibilidade da germinação de *V. lecanii*, observaram resultados semelhantes com a exposição dos conídios por até 240 minutos. Entretanto, os autores usaram câmara de radiação com lâmpadas de menor intensidade. Esses resultados possibilitaram estabelecer a distância de 33 cm das lâmpadas UV aos conídios e o período de incubação de 20 h como os mais adequados para os testes de sensibilidade da germinação de conídios e do estabelecimento de *Lecanicillium* em lesões de ferrugem.

As metodologias utilizadas foram semelhantes às usadas por Braga et al. (2002) em estudo com sensibilidade da germinação de conídios de *V. lecanii* em meio de cultura e por Costa (2011) trabalhando com *C. rosea* em discos de folha de morangueiro.

No teste de seleção de isolados de *Lecanicillium* tolerantes à radiação UV-B, a dose $6,18 \text{ KJ m}^{-2}$ causou maior redução da germinação de conídios comparada com a dose $4,12 \text{ KJ m}^{-2}$. Braga et al. (2001a) observaram resultados semelhantes com a maior redução na germinação ou inativação de conídios de *M. anisopliae* expostos a doses crescentes de radiação UV-B.

Os 10 isolados de *Lecanicillium* utilizados apresentaram diferentes níveis de sensibilidade. O isolado CCMA-1142 o mais sensível, com 34,57% de germinação relativa e o CCMA-1140 o mais tolerante com 81,59% (Tabela 4). Fernandes et al. (2007) testaram a sensibilidade de 60 isolados de *Beauveria* spp. à radiação UV-B e a germinação de conídios oscilou entre 0 e 80%, confirmando os resultados do presente trabalho. No entanto, Costa (2011) testou a sensibilidade de *Trichoderma* à radiação UV-B e não observou diferença da germinação de conídios entre os isolados. O autor sugere que poderão ocorrer essas diferenças utilizando maiores doses de radiação.

Nos testes para seleção do isolado mais tolerante à radiação UV-B, ficou evidenciada a diferença de níveis de tolerância a doses crescentes de radiação UV-B, entre os seis isolados de *Lecanicillium* testados (Tabela 4) observada nas curvas de

sobrevivência, com destaque para as DL_{50} . As causas para esse efeito podem estar na adaptação dos isolados aos locais de origem, com diferentes incidências de radiação UV-B (PIAZENA, 1996), variabilidade genética (FERNANDES et al., 2007) e plasticidade genotípica (BRAGA et al., 2001a; RANGEL et al., 2004; RANGEL et al., 2005; RANGEL et al., 2006). O isolado CCMA-1143 foi o mais tolerante à radiação UV-B ($DL_{50} = 6,57 \text{ KJ m}^{-2}$) e o isolado mais sensível o CCMA-1142 com $DL_{50} = 1,54 \text{ KJ m}^{-2}$.

Para estudar a sensibilidade de conídios de *Lecanicillium* em diversos estádios de germinação foi utilizado o isolado CCMA-1143. A dose de radiação aplicada foi $6,57 \text{ KJ m}^{-2}$ (DL_{50} para esse isolado). Os tratamentos com conídios não expostos à radiação UV-B apresentaram germinação próximo de 100% em todos os períodos de incubação. Os conídios imediatamente irradiados (tempo 0 de incubação) apresentaram germinação próxima a 50%. A incubação por 3 a 9 h, anteriores à irradiação, causou redução da germinação de conídios de *L. lecanii*. Possivelmente, nesse período os conídios iniciaram o processo de germinação sendo mais sensível a radiação UV-B. Conídios de *L. lecanii* incubados por 6 h antes da irradiação mostraram-se mais sensíveis, com praticamente 100% de inibição da germinação (Figura 6). Costa (2011) obteve as mesmas tendências para os agentes de biocontrole *C. rosea* e *Trichoderma*. Braga et al. (2001a) estudaram os mesmos efeitos em *Metarhizium* e observam que a radiação afeta distintamente vários estádios de germinação. Os autores discutem que a maior sensibilidade foi verificada no estádio de maior atividade metabólica quando ocorre a duplicação do DNA, durante a germinação. Essa macromolécula é um cromóforo da radiação ultravioleta-B (KUNZ et al., 2006).

Em testes preliminares, os conídios de *L. lecanii* CM 1143 germinaram após 12 h de incubação (dados não apresentados). Nesse estudo, após 12 ou mais horas de incubação anteriores à exposição à radiação UV-B, a maior parte dos conídios já estava germinada e não houve interferência do tratamento sobre a germinação.

No estudo sobre os efeitos da radiação UV-B associada a temperaturas foi utilizado o isolado CCMA-1143 e aplicado nos conídios a dose $6,57 \text{ KJ m}^{-2}$ de radiação UV-B (DL_{50} para esse isolado). As temperaturas de incubação, após a radiação foram de 19; 22; 25 e 28 °C, estando dentro da faixa favorável para esse fungo (MONTEIRO et al., 2004). Não houve interação entre a radiação UV-B e temperaturas, exceto para 19 °C. Essa temperatura causou drástica redução na germinação de conídios. Pearson et al. (1997)

estudaram os efeitos da radiação UV sobre *Serratia* spp. e verificaram que as variáveis temperatura e comprimento de onda da radiação UV interferem no tempo de sobrevivência em cepas desse gênero de bactérias, aumentando o desenvolvimento sob temperatura ambiente em comparação com o desenvolvimento em meio refrigerado, onde não houve multiplicação de células. Nos tratamentos com temperatura de incubação de 22, 25 e 28 °C houve aumento na porcentagem de germinação de conídios (Tabela 5), mas a diferença não foi significativa. Os efeitos da temperatura sobre a germinação de conídios foram semelhantes aos observados por Zimmermann (1982) em estudo com *M. anisopliae*.

Nos testes sobre efeitos da ação conjunta de radiação UV-B e concentrações de CO₂ do ar na sensibilidade da germinação de conídios de *Lecanicillium* não foram verificadas diferenças entre os tratamentos. Os resultados coincidem com os trabalhos de Mendes (2009) sobre a associação da concentração de CO₂ do ar e o parasitismo da ferrugem do cafeeiro por *Lecanicillium longisporum*. A autora conclui que os efeitos desse antagonista independem da concentração desse gás no ar.

Nos estudos sobre o efeito da radiação UV-B no estabelecimento de *Lecanicillium* em lesões de ferrugem em discos de folhas de cafeeiro observou-se que ocorreu diferença significativa entre os tratamentos com inoculação de *Lecanicillium* e tratamentos sem a inoculação. Houve uma tendência de redução na incidência de *Lecanicillium* com a maior dose de radiação e nos tratamentos sem inoculação a radiação UV-B reduziu a incidência natural do antagonista nas lesões de ferrugem. Nos tratamentos com a inoculação de *Lecanicillium* a radiação UV-B aumentou a incidência do antagonista (Figura 8). A redução da incidência de *Lecanicillium* nos tratamentos não inoculados pode ter ocorrido devido à diversidade genética do antagonista presente no hospedeiro, contendo cepas com diferentes níveis de tolerância à radiação UV-B, inativando os mais sensíveis. Nos tratamentos com a inoculação do antagonista foi utilizado o isolado CCMA-1143 selecionado pela maior tolerância a essa radiação nos testes anteriores desse trabalho.

A introdução, em alta concentração, de conídios de um isolado tolerante à radiação UV-B, possivelmente favoreceu o estabelecimento do antagonista nas lesões, considerando-se que a radiação pode ter alterado a microbiota do filoplano e o papel regulatório das populações de microrganismos associados ao controle biológico natural da ferrugem do cafeeiro. Apesar de ainda não ser utilizado comercialmente esse antagonista para

o controle da ferrugem do cafeeiro, é importante estudar todos os aspectos relacionados com o seu potencial, pois com as possíveis alterações de sistemas de cultivos, não só do cafeeiro, esse antagonista poderá ter o seu uso ampliado em curto espaço de tempo.

6. CONCLUSÕES

1. A radiação UV-B é biologicamente efetiva sobre a germinação de conídios de *Lecanicillium lecanii*.
2. *Lecanicillium lecanii* tem níveis de sensibilidade à radiação UV-B em diferentes estádios de germinação de conídios e os seus isolados expressam diferentes tolerâncias à radiação UV-B.
3. As variáveis temperatura e concentração de CO₂ do ar não interferem na sensibilidade da germinação de conídios de *L. lecanii* sob efeito da radiação UV-B.
4. As respostas da sensibilidade de *L. lecanii* sob efeito da radiação UV-B, nos testes em lesões de ferrugem em discos de folhas de cafeeiro, mostram tendências diferentes em comparação com os resultados verificados nos testes em meio de cultura.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5 ed. London: Elsevier, 2004. 922 p.
- ALVARADO-GUTIERREZ, A.; REAL-MONROE, M.; GUERRA, R. R.; SANCHES, L. A.; LOZOYA-GLORIA, E.; FRAIRE-VELÁZQUES, 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**, London, v. 72, n. 4/6, p. 111-121, 2008.
- ANTOIGNONI, F.; ZHENG, S.; PAGNUCCO, C.; BERARDI, R.; POLI, F.; BIONDI, S. Induction of flavonoid production by UV-B radiation in *Passiflora quadrangularis* callus cultures. **Fitoterapia**, Milan, v. 78, n. 5, p. 345-352, 2007.
- ASSAD, E. D.; PINTO, H. S.; JUNIOR, J. Z.; ÁVILA, A. M. H. Impactos das mudanças climáticas no zoneamento agroclimático do café no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 39, n. 11, p. 1057-1064, 2004.
- BAILEY, P.; BAKER, G.; CAON, G. Field efficacy and persistence of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* against *Epiphyas postvittana* (Walker) (Lepidoptera: Tortricidae) in relation to larval behaviour on grapevine leaves. **Australian Journal of Entomology**, Canberra, v. 35, p. 297-302, 1996.
- BALLARÉ, C. L. Stress under the sun: spotlight on ultraviolet-B responses. **Plant Physiology**, Washington, DC, v. 132, n. 4, p. 1725-1727, 2003.
- BENHAMOU, N. Potential of the mycoparasite, *Verticillium lecanii*, to protect citrus fruit against *Penicillium digitatum*, the causal agent of green mold: a comparison with the effect of chitosan. **Phytopathology**, St. Paul, v. 94, p. 693-705, 2004.

BENHAMOU, N.; BRODEUR, J. Evidence for antibiosis and induced host defense reactions in the interaction between *Verticillium lecanii* and *Penicillium digitatum*, the causal agent of green mold. **Phytopathology**, St. Paul, v. 90, n. 9, p. 932-943, 2000.

BETTIOL, W. Biopesticide use and research in Brazil. **Outlooks on pest management**, Hemehepstead, v. 22, n. 6, p. 280-283, 2011.

BETTIOL, W. Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (Ed.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA/CNPDA. 1991. p. 1-5.

BETTIOL, W. Impacto potencial das mudanças climáticas sobre o controle biológico de doenças de plantas. In: GHINI, R.; HAMADA, E. (Ed.). **Mudanças climáticas: impactos sobre doenças de plantas no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. 331 p.

BOLDINI, J. M. **Epidemiologia da ferrugem e da cercosporiose em cafeeiro irrigado e fertirrigado**. 2001. 67 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Fitopatologia)-Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

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**, Research Triangle Park, v. 117, n. 4, p. 508-514, Dec. 2009.

BRAGA, G. U. L.; RANGEL, D. E. N.; FLINT, S. D.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Conidial pigmentation is important to tolerance against solar-simulated radiation in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Photochemistry and Photobiology**, Lausanne, v. 82, n. 2, p. 418-422, 2006.

BRAGA, G. U. L.; RANGEL, D. E. N.; FLINT, S. D.; MILLER, C. D.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Damage and recovery from UV-B exposure in conidia of the entomopathogens *Verticillium lecanii* and *Aphanocladium album*. **Mycologia**, New York, v. 94, n. 6, p. 912-920, 2002.

BRAGA, G. U. L.; FLINT, S.; MESSIAS, C. L.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Effects of UV-B on conidia and germlings of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, n. 4, p. 874-882, 2001a.

BRAGA, G. U. L.; FLINT, S.; MESSIAS, C. L.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Effects of UVB irradiance on conidia and germinants of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*: a study of reciprocity and recovery. **Photochemistry and Photobiology**, Lausanne, v. 73, n. 2, p. 140-146, 2001b.

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

BRITO, G. G.; CAIXETA, E. T.; GALLINA, A. P.; ZAMBOLIM, E. M.; ZAMBOLIM, L. Inheritance of coffee leaf rust resistance and identification of AFLP markers linked to the resistance gene. **Euphytica**, Wageningen, v. 173, n. 2, p. 255-264, 2010.

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

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

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

CALDWELL, M. M.; BALLARÉ, C. L.; BORNMAN, J. F.; FLINT, S.; BJORN, L. O.; TERAMURA, A. L.; KULANDAIVELU, G.; TEVINI, M. Terrestrial ecosystems, increased solar ultraviolet radiation and interactions with other climatic change factors. **Photochemistry and Photobiology**, Lausanne, n. 2, p. 29-38, 2003.

CARRION, G.; RICO-GRAY, V. Mycoparasites on the coffee rust in Mexico. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v. 11, p. 49-60, 2002.

CARVALHO, V. L.; CUNHA, R. L.; CHALFOUN, S. M. Manejo ecológico das principais doenças do cafeeiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 23, n. 214/215, p. 101-114, 2002.

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

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Café**. Safra 2011-2012. Disponível em: <[www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/BoletimCafé-Janeiro 2011-12. pdf](http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/BoletimCafé-Janeiro%202011-12.pdf)>. Acesso em: 12 mar. 2012.

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

COSTA, L. B. **Efeito da radiação Ultravioleta-B sobre *Trichoderma* spp. e *Clonostachys rosea*, agentes de biocontrole de fitopatógenos**. 2011. 80 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

- ESKES, A. B. The use of leaf disk inoculations in assessing resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*). **Netherlands Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 88, p. 127-141, 1982.
- FERNANDES, E. K. K.; RANGEL, D. E. N.; MORAES, A. M. L.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; ROBERTS, D. W. Variability in tolerance to UV-B radiation among *Beauveria* spp. isolates. **Journal of Invertebrate Pathology**, Riverside, v. 96, n. 6, p. 237-243, 2007.
- FINCKHA, M. R.; CHAVES, A. Q.; DAI, Q.; TENG, P. S.; Effects of enhanced UV-B radiation on the growth of rice and its susceptibility to rice blast under glasshouse conditions. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Manila, n. 52, p. 223-233, 1995.
- FLINT, S. D.; CALDWELL, M. M. Field testing of UV biological spectral weighting functions for higher plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 117, p. 145-153, 2003.
- FLINT, S. D.; RYEL, R. J.; HUDELSON, T. J.; CALDWELL, M. M. Serious complications in experiments in which UV doses are effected by using different lamp heights. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, Lausanne, v. 97, p. 48-53, 2009.
- GAN, Z.; YANG, J.; TAO, N.; LIANG, L.; MI, Q.; LI, J.; ZHANG, Q. Cloning of the gene *Lecanicillium psalliotae* chitinase Lpch1 and identification of its potential role in the biocontrol of root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Applied Microbiology Biotechnology**, Oxford, v. 76, p. 1309-1317, 2007.
- GARÇON, C. L. P.; ZAMBOLIM, L.; MIZUBUTI, E. S. G.; VALE, F. X. R.; COSTA, H. Controle da ferrugem do cafeeiro com base no valor de severidade. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 29, n. 5, p. 486-491, 2004.
- GERHARDT, K. E.; WILSON, M.; GREENBERG, B. M. Tryptophan photolysis leads to a UVB-Induced 66 kDa photoproduct of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, Lausanne, v. 70, n. 1, p. 49-56, 1999.
- GHINI, R. **Mudanças climáticas globais e doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA/MEIO AMBIENTE, 2005. 104 p.
- GHINI, R.; HAMADA, E.; GONÇALVES, R. R. V.; GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J. C. R. Análise de risco das mudanças climáticas globais sobre a sigatoka-negra da bananeira no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 32, n. 3, p. 197-204, 2007.
- GODIN-BEEKMANN, S. Spatial observation of the ozone layer. **Comptes Rendus Geoscience**, Paris, v. 342, n. 4/5, p. 339-348, 2010.

GOETTEL, M. S.; KOIKE, M.; KIM, J. J.; AIUCHI, D.; SHINYA, R.; BRODEUR, J. Potential of *Lecanicillium* spp. for management of insects, nematodes and plant diseases. **Journal of Invertebrate Pathology**, Riverside, v. 98, p. 256-261, 2008.

GOLDSON, S. L. Climate change and biological control. In: NEWTON, P. C. D. et al. **Agroecosystems in a changing climate**. New York: CRC Press, 2006. p. 329-332.

HADDAD, F.; MAFFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S. G.; TEIXEIRA, H. Biological control of coffee rust by antagonistic bacteria under field conditions in Brazil. **Biological Control**, Orlando, v. 49, p. 114-119, 2009.

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**, London, v. 2, n. 1, p. 39-50, Jan. 2003.

HALL, R. A. Control of aphids by the fungus, *Verticillium lecanii*: effect of spore concentration. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 27, p. 1-5, 1980.

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

INTERGOVERNAMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE, 2007: the physical science basis: summary for policymakers. Genova: Intergovernmental Panel on Climate Change, 2007. 18 p. (IPCC Assessment Report, 4). Disponível em: <<http://www.ipcc.ch/SPM2feb07.pdf>>. Acesso em: 01 maio 2012.

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

JACKSON, D.; SKILLMAN, J.; VANDERMEER, J. Indirect biological control of the coffee leaf rust, *Hemileia vastatrix*, by the entomogenous fungus *Lecanicillium lecanii* in a complex coffee agroecosystem. **Biological Control**, Orlando, v. 61, p. 89-97, 2012.

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

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**, New York, v. 255, n. 1, p. 1-40, Jan. 2006.

LEINHOS, G. M. E.; BUCHENAUER, H. Hyperparasitism of selected fungi on rust fungi of cereal. **Zeitschrift Fuer Pflanzenkr. Pflanzenschutz**, Stuttgart, v. 99, p. 482-498, 1992.

- LIN, B. B. Agroforestry management as an adaptive strategy against potential microclimate extremes in coffee agriculture. **Agricultural and Forest Meteorology**, Amsterdam, v. 144, p. 85-94, 2007.
- MAFFIA, L. A.; HADDAD, F.; MIZUBUTI, E. S. G.; Controle biológico da ferrugem do cafeeiro. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. cap. 17, p. 267-275.
- MAHFUD, M. C.; MIOR-AHMAD, Z. A.; MEON, Z.; KADIR, J. In vitro and in vivo tests for parasitism of *Verticillium psalliotae* Treschow on *Hemileia Vastatrix* BERK. and BR. **Malaysian Journal of Microbiology**, Penang, v. 2, n. 1, p. 46-50, 2006.
- MANDRONICH, 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**, Lausanne, v. 46, n. 1/3, p. 5-19, Jan. 1998.
- MANNING, W. J.; TIEDEMANN, A. V. Climate change: potential effects of increased atmospheric carbon dioxide (CO₂), ozone (O₃), and ultraviolet-b (UV-B) radiation on plant diseases. **Environmental Pollution**, Barking, v. 88, p. 219-245, 1995.
- MAZZA, C. A.; BOCCALANDRO, H. E.; GIORDANO, C. V.; BATTISTA, D.; SCOPEL, A. L.; BALLARÉ, C. L. Functional significance and induction by solar radiation of ultraviolet-absorbing Sunscreens in Field-Grown Soybean Crops. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 122, p. 117-125, 2000.
- MCKENZIE, R. L.; BJORN, L. O.; BAIS, A.; ILYASD, M. Changes in biologically-active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. **Photochemical & Photobiological Sciences**, London, v. 6, n. 3, p. 218-231, 2007.
- MENDES, L. **Impacto do aumento da concentração de CO₂ atmosférico sobre o período latente e o controle biológico da ferrugem do cafeeiro**. 2009. 42 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas)-Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009.
- MICHEREFF FILHO, M.; FARIA, M.; WRAIGHT, S. P.; SILVA, K. F. A. S. Micoínseticidas e micoacaricidas no Brasil: como estamos após quatro décadas? **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, n. 4, p. 769-779, jan.-jun. 2009.
- MILLER, T. C.; GUBLER, W. D.; LAEMMLEN, F. F.; GENG, S.; RIZZO, D. M. Potential for using *Lecanicillium lecanii* for suppression of strawberry powdery mildew. **Biocontrol Science and Technology**, oxford, v. 14, n. 2, p. 215 -220, 2004.
- MOHAMMED, A. R.; TARPLEY, L. Differential response of southern US rice (*Oryza sativa* L.) cultivars to ultraviolet-B radiation. **Journal of Agronomy and Crop Science**, Hoboken, v. 196, n. 4, p. 286-295, Feb. 2010.

MONTEIRO, A. C.; BARBOSA, C. C.; CORREIA, A. C. B.; PEREIRA, G.; T. Crescimento e esporulação de isolados de *Verticillium lecanii* sob diferentes fatores ambientais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 39, n. 6, p. 561-565, Jun. 2004.

MORANDI, M. A. B.; PAULA JUNIOR, T. J.; BETTIOL, W.; TEIXEIRA, H. Controle biológico de fungos fitopatogênicos. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 30, n. 251, p. 73-82, jul-ago, 2009.

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**, Oxford, v. 16, n. 6, p. 619-630, 2006.

ORTH, A. B.; TERAMURA, A. H.; SISLER, H. D. Effects of ultraviolet radiation on fungal disease development in *Cucumis sativus*. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 77, n. 9, p. 1188-1192, 1990.

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

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

PEARSON, J. F.; HUNT, L. M.; MITCHELL, K. F. UV radiation and temperature affect viability of *Serratia* spp., potential biocontrol agents of insects. In: NEW ZEALAND PLANT PROTECTION SOCIETY'S ANNUAL CONFERENCE, 50., 1997, Lincoln. **Proceedings...** Christchurch: NZPPS, 1997. p. 169-173.

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

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

RANGEL, D. E. N.; FERNANDES, E. K.; BRAGA, G. U. L.; ROBERTS, D. W. Influence of growth environment on tolerance to UV-B radiation, germination speed, and morphology of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* conidia. **Journal of Invertebrate Pathology**, Riverside, v. 90, n. 1, p. 55-58, 2005.

RANGEL, D. E. N.; BUTLER, M. J.; TORABINEJAD, J.; ANDERSON, A. J.; BRAGA, G. U. I.; DAY, A. W.; ROBERTS, D. W. Mutants and isolates of *Metarhizium anisopliae* are diverse in their relationships between conidial pigmentation and stress tolerance. **Journal of Invertebrate Pathology**, Riverside, v. 93, p. 179-182, 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**, Riverside, v. 87, p. 77-83, 2004.

RAVIV, M.; ANTIGNUS, Y. UV Radiation effects on pathogens and insect pests of greenhouse-grown crops. **Photochemistry and Photobiology**, Lausanne, v. 79, n. 3, p. 219-226, 2004.

REDDY, N. P.; KHAN, P. 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**, Sussex, v. 64, n. 9, p. 909-915, 2008.

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

SCHIAVE, L. A.; PEDROSO, R. S.; CANDIDO, R. C.; ROBERTS, D. W.; BRAGA, G. U. L. Variability in UVB tolerances of melanized and nonmelanized cells of *Cryptococcus neoformans* and *C. laurentii*. **Photochemistry and Photobiology**, Lausanne, v. 85, p. 205-213, 2009.

SERA, G. H.; SERA, T.; ITO, D. S.; AZEVEDO, J. A.; MATA, J. S.; DÓI, D. S.; RIBEIRO, C. F.; KANAYAMA, F. S. Resistance to leaf rust in coffee carrying SH3 gene and others SH genes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 50, n. 5, p. 753-757, 2007.

SHAW, D. E. *Verticillium lecanii* a hyperparasite on the coffee rust pathogen in Papua New Guinea. **Australasian Plant Pathology**, Adelaide, v. 17, n. 1, 1988.

TANHUA, T.; JONES, E. P.; JUTTERSTRÖM, S.; SMETHIE Jr.; W. M.; WALLACE, D. W. R.; ANDERSON, L. G. Ventilation of the arctic ocean: mean ages and inventories of anthropogenic CO₂ and CFC-11. **Journal of Geophysical Research-Oceans**, Washington, DC, v. 114, n. 1, p. 1-11, Jan. 2009.

TERAMURA, A. H.; SULLIVAN, J. H. Effects of UV-B radiation on photosynthesis and growth of terrestrial plants. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 39, p. 463-473, 1994.

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

VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L.; JESUS JUNIOR, W. C. Efeito da temperatura no período latente de *Hemileia vastatrix* Berk & Br., agente causal da ferrugem do cafeeiro. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 1., 2000, Poços de Caldas. **Resumos Expandidos...** Brasília, DF: Embrapa Café, 2000. p. 175-178.

VAN DER LEUN, J.; TANG, X.; TEVINI, M. Environmental effects of ozone depletion and its interactions with climate change: 2002 assessment. **Photochemical & Photobiological Science**, London, v. 2, p. 1vii-1-vii, 2003.

VANDERMEER, J.; PERFECTO, I.; LIERE, H. Evidence for hyperparasitism of coffee rust (*Hemileia vastatrix*) by the entomogenous fungus, *Lecanicillium lecanii*, through a complex ecological web. **Plant Pathology**, Washington, DC, v. 58, p. 636-641, 2009.

VEGA, O. F.; CLARO, O. E. Experiencias en Cuba con *Lecanicillium* spp. Gams e Zare. **Boletín Fitossanitário**, Havana, v. 12, p. 25-41, 2007.

VERHAAR, M. A.; OSTERGAARD, K. K.; HIJWEGEN, T.; ZADOCS, J. C. Preventative and curative applications of *Verticillium lecanii* for biological control of cucumber powdery mildew. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v.7, n. 4, p. 543-552, 1997.

WARRIOR, P.; KONDURU, K.; VASUDEVAN, P. Formulation of biological control agents for pest and disease management. In: GNANAMANICKAM, S. S. (Ed.). **Biological control of crop diseases**. New York: Marcel Dekker, 2002. chap. 18, p. 421-441.

WU, J.; GUAN, D.; YUAN, F.; ZHANG, X. Research advances on the biological effects of elevated ultraviolet-B radiation on terrestrial plants. **Journal of Forestry Research**, Colombo, v. 20, n. 4, p. 383-390, 2009.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, E. M. Doenças do cafeeiro. In: KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 165-180.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; PEREIRA, A. A.; CHAVES, G. M. Café (*Coffea arabica* L.), controle de doenças. In: VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 1997. v. 1. p. 83-140.

ZARE, R.; GAMS, W. A revision of the *Verticillium fungicola* species complex and its affinity with the genus *Lecanicillium*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 112, p. 811-824, 2008.

ZHAO, D.; REDDY, K. R.; KAKANI, V. G.; MOHAMED, A. R.; READ, J. J.; GAO, W. Leaf and canopy photosynthetic characteristics of cotton (*Gossypium hirsutum*) under elevated CO₂ concentration and UV-B radiation. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 161, n. 5, p. 581-590, 2004.

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