

Reduzindo o Efeito da Radiação Ultravioleta sobre Leveduras para o Controle de Podridões Pós-colheita de Frutas

Mitigating the Effect of Ultraviolet Radiation over Yeast Applied for the Control of Post-harvest Decay of Fruits

Ana Paula Carvalho¹; Ítala Layanne Alves²; Thalita Freitas²; Carliana Araújo¹; Paulo Ivan Fernandes Junior³; Carlos Alberto Tuão Gava⁴

Abstract

Climate change caused by anthropic activities resulted on ozone layer reduction. So, the reduction of the efficacy of the atmospheric to filtrate incident solar radiation have had become a threat to plants and also to microbial communities associated to them. A few studies have being conducted in order to evaluate and mitigate such effects, mainly considering microbes applied as biological control agents of pest and diseases. In this study, we evaluated natural tolerance of yeasts isolates of L7K and L10 that were previously selected as biocontrol agents for post-harvest fruit decay, and also the selected photoprotectant compounds as adjuvants of yeast formulations. In the first experiment, the isolates were exposed to increasing doses of UV-B radiation from an artificial source. Both isolates L7K and L10 were highly susceptible to UV exposure, reducing viable cell counts to lower than 50% in the minor radiation dose tested (2,050.0 mJ.cm⁻²). In the second experiment, exposing a technical preparation of yeast containing photoprotectant compounds to 4.100,0 mJ.cm⁻², it was verified that none of the compounds were effective to protect the isolate L7K, however Neoheliopan E1000 (NH-E1000) and starch were highly effective to isolate L10, achieving effective concentration lower than 2% (w/v).

Keywords: UV-B radiation, photoprotectors, biological control.

Introdução

Cerca de 30% da radiação ultravioleta emitida pelo sol é refletida pela atmosfera terrestre e, da radiação transmitida, apenas 5% é radiação UV-B (280nm-315 nm), com potencial de causar danos às moléculas e aos sistemas biológicos (GAO; GARCIA-PICHEL, 2011). As alterações causadas pelas atividades antrópicas têm resultado na redução da camada de ozônio e, conseqüentemente, limitando a capacidade da atmosfera em filtrar as radiações incidentes. Como efeito dessa mudança, têm-se observado danos tanto sobre as plantas, quanto sobre as populações de micro-organismos a elas associadas, tanto patogênicos como epífitas ou endófitas (MENEZES et al., 2014; SÁBER, 2010).

¹Mestranda, Universidade do Estado da Bahia, Campus Juazeiro, Juazeiro, BA.

²Graduanda de Biologia, Universidade do Estado de Pernambuco, Campus Petrolina, Petrolina, PE.

³Biólogo, D.Sc. em Agronomia, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, paulo.ivan@embrapa.br.

⁴Engenheiro-agrônomo, D.Sc. em Proteção de Plantas, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, carlos.gava@embrapa.br.

A aplicação de agentes de controle biológico (ACB) para o controle de podridões pós-colheita em frutos e hortaliças se tornou uma alternativa promissora, considerando-se que a principal estratégia disponível, a aplicação pós-colheita de fungicidas, traz riscos elevados de intoxicação ao consumidor. Entre os ACB's, as leveduras vêm recebendo maior atenção tanto pela eficiência de controle quanto pela maior aceitabilidade pelos consumidores (BAUTISTA-ROSALES et al., 2013). Na cadeia produtiva de frutas, as maiores perdas são causadas por patógenos que infectam resíduos florais e outros que são capazes de produzir infecções quiescentes (SNOWDON, 2010; VIRET et al., 2004), ambos requerendo aplicações pré-colheita dos ACB's e expondo-os aos efeitos deletérios do clima, como incidência da radiação UV, temperatura e umidade relativa.

Embora a radiação UV-B tenha, conhecidamente, efeitos deletérios sobre os micro-organismos, poucos estudos têm sido realizados para a avaliação e mitigação deste efeito sobre os agentes de controle de patógenos. Na região do Vale do São Francisco, a incidência de radiação total e os índices de UV elevados durante todo o ano e o possível agravamento dessa condição em função das alterações projetadas pelas mudanças climáticas, indicam a necessidade da inclusão de uma etapa de avaliação da suscetibilidade dos ACB's e de medidas mitigadoras dos impactos projetados.

Os fotoprotetores ou filtros solares reduzem os danos sobre as membranas celulares refletindo ou absorvendo a energia das ondas de radiação UV, devendo ser eficaz em maior espectro de comprimento de onda, principalmente entre 290 nm a cerca de 370 nm-400 nm (BURGESS, 1998) e apresentar estabilidade por algumas horas após a pulverização no campo (EDGINGTON et al., 2000). No entanto, do ponto de vista econômico, esses fotoprotetores devem ser passíveis de uso em baixa concentração nas formulações comerciais, de forma a ser tornar economicamente viável.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a suscetibilidade natural de isolados promissores de levedura e selecionar fotoprotetores com potencial de uso em futuras formulações.

Material e Métodos

Os isolados de levedura L7K e L10 foram cultivados em meio de cultura líquido SD-Y (peptona, dextrina e extrato de levedura) com agitação (agitador orbital) a 120 rpm por 72 horas a 28 °C. Após o crescimento foram centrifugados a 5.000 rpm por 5 minutos, com a adição de NaCl 0,8% por duas vezes para a remoção de resíduos do meio de cultura.

Para a avaliação da tolerância natural a UV-B, suspensões (1×10^6 céls mL⁻¹) dos isolados L7K e L10 foram pulverizadas em lâminas de microscopia, dispostas em placas de Petri e secas em câmara de fluxo a temperatura ambiente (28 °C). Posteriormente, as lâminas foram expostas à radiação UV-B, fornecida por lâmpadas fluorescentes TL 20W/12 RS, com pico de emissão UV na faixa de 300 nm, em câmara estéril, como descrito por Santos et al. (2010). A irradiação sobre a superfície das placas foi medida com um radiômetro portátil (UV-35), equipado com um fotosensor contendo um filtro espectral UV. As lâminas foram expostas a 40 cm da lâmpada por um período variável entre 2 e 15 minutos.

Em seguida, as células de leveduras foram removidas por agitação em solução de Triton X-100 0,05% por 30 minutos. Uma alíquota de 100 µl da suspensão foi semeada em placa de Petri contendo meio de cultura

BDA (batata, dextrose e ágar). As placas foram colocadas em sala de incubação durante 96 horas, em temperatura de 28°C e fotoperíodo de 12 horas e, em seguida, foi realizada a contagem do número de colônias.

Dextrina, amido, caseína, Neo Heliopan AV (metoxicinamato de octila) – NHAV, Neo Heliopan E1000 - (metoxicinamato de isoamila) - NHE1000 e oxibenzona foram utilizados para a confecção de preparações técnicas de fotoprotetores contendo 1×10^6 céls mL⁻¹ e concentrações de 0%, 2%, 4%, 6%, 8% e 10% dos ingredientes ativos. As preparações foram elaboradas em ADE para os fotoprotetores hidrofílicos e em Triton X-100 0,05% para os fotoprotetores hidrofóbicos.

As preparações foram pulverizadas em lâminas de microscopia, dispostas em placas de Petri e secas em câmara de fluxo a temperatura ambiente (24 °C). Em seguida, foram tratadas durante 5 minutos, nas mesmas condições anteriores. A dose de radiação aplicada foi de 4.110,0 J m⁻² (irradiância 13,7 W m⁻²). O tratamento controle foi mantido nas mesmas condições, protegidos por folha de alumínio. Em seguida, adotou-se o mesmo procedimento descrito anteriormente.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e os resultados foram submetidos à análise de variância (Anova) e regressão linear, quando cabível. O índice de culturabilidade relativa (C%) foi obtido pela equação: $C\% = C_0/C_{ij} \times 100$, na qual C₀ = colônias no tratamento controle e C_{ij} = colônias nos tratamentos. O termo culturabilidade relativa refere-se ao número de colônias obtidos a partir da extração das células microbianas das superfícies expostas a UV-B em comparação a um tratamento não exposto para cada composto e dose.

Resultados e Discussão

De modo geral, os isolados apresentaram alta suscetibilidade à radiação UV nas condições experimentais empregadas. Na Figura 1, verifica-se que, em ambos os casos, na primeira dose de radiação aplicada (2.050,0 mJ.cm⁻²) a taxa de culturabilidade ficou inferior a 50% e que na dose de 4.110 mJ.cm⁻², a culturabilidade dos isolados, ou seja, o número de células viáveis em relação ao tratamento controle, foi próximo a zero. Estes agentes de controle foram selecionados quanto à eficiência de controle de podridões pós-colheita em uva e manga e a suscetibilidade à UV-B pode ser explicada pelo fato de ambas serem oriundas do endocarpo de bagas de uva.

A elevada suscetibilidade dos isolados a UV-B pode reduzir sua eficiência após a sua aplicação em condições de campo, mesmo considerando-se a colonização de nichos existentes na epiderme dos frutos. Assim, a formulação dos ACB's requer a inclusão de compostos fotoprotetores que permitam sua sobrevivência até o acionamento de mecanismos de reparo e sobrevivência.

As preparações técnicas utilizadas apresentaram efeito dependente dos isolados e dos produtos aplicados. Para o isolado L7K, não se verificou efeito fotoprotetor dos polímeros orgânicos amido, caseína e dextrina, enquanto a oxibenzona e os derivados de metoxicinamato (NH-EV e NH E1000) apresentaram efeito dependente da dose e com aumento linear da proteção (Figura 2a). Contudo, a dose mínima necessária para manutenção de 50% da culturabilidade (DM₅₀) é elevada: 5,29%, 6,85% e 7,74% (m/v) para oxibenzona, NH-EV e NH E1000, respectivamente (Tabela 1); aumentando o custo final da aplicação dos agentes de controle.

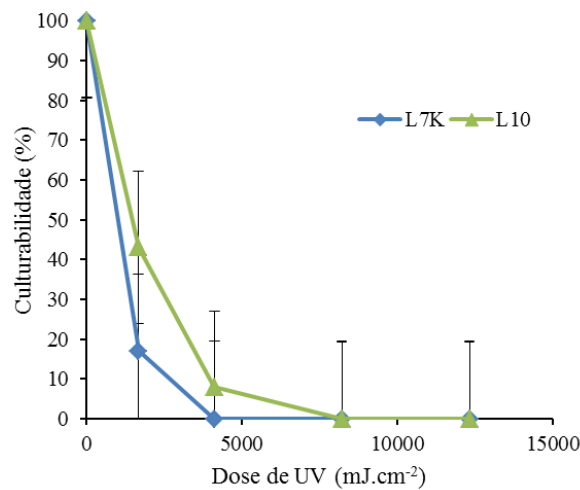


Figura 1. Culturabilidade relativa dos isolados de levedura desafiados à doses crescentes de energia aplicada por uma lâmpada UV-B com pico de emissão UV na faixa 340nm-420nm.

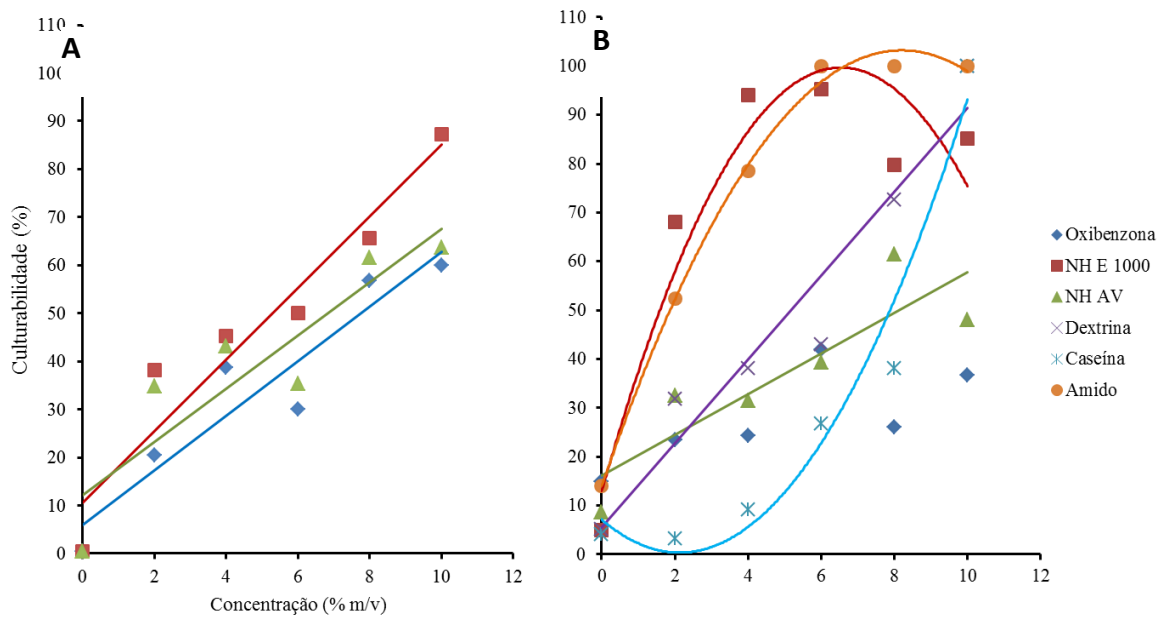


Figura 2. Culturabilidade relativa dos isolados L7K (a) e L10 (b) após a aplicação em superfície esterilizada e submetida a uma dose de 4.110 mJ cm⁻².

Para o isolado L10, a adição de doses crescentes de oxibenzona à preparação técnica não obteve resultado significativo ($P > 0,05$). A adição de caseína, amido e NH-E100 apresentaram efeito linear quadrático e significativo, embora a caseína tenha apresentado o coeficiente angular negativo, indicando que o efeito só foi observado a partir de doses mais altas do composto (Figura 2b). Dextrina e NH-AV apresentaram efeito linear de primeira ordem significativo, não alcançando o máximo de proteção no intervalo estudado. Para esse isolado, amido e NH-E100 apresentaram DM_{50} de 1,87% e 1,55% (m/v), respectivamente.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam elevada suscetibilidade dos isolados à radiação UV e, portanto, a necessidade de garantir alguma proteção às células microbianas após sua aplicação, permitindo

a colonização inicial dos sítios na superfície de folhas, flores e frutos. No entanto, como indicado por Burgess et al. (1998) e Edgington et al. (2000), a proteção dos agentes de controle e os custos da formulação final devem ser considerados de forma a permitir a competição com os produtos convencionais. Assim, considerando-se os custos para a aplicação na calda de pulverização, as concentrações da DM₅₀ dos produtos selecionados para L7K foram muito elevadas, enquanto as doses de inferiores a 2% (m/v) de NH-E1000 e amido são economicamente viáveis para L10.

Tabela 1. Equações de regressão linear obtidas pelo método dos mínimos quadrados para as doses de fotoprotetores utilizados em preparação técnica, seguido da dose mínima para obtenção de 50% da culturabilidade relativa.

Fotoprotetor	Equação	R ^{2a}	DM ₅₀ ^b
L7K			
NHE 1000	$\hat{y} = 7,4471x + 10,581$	0,72	5,29
NHAV	$\hat{y} = 5,54x + 12,133$	0,67	6,85
Oxibenzona	$\hat{y} = 5,6814x + 5,9762$	0,69	7,74
L10			
Amido	$\hat{y} = -1,3229x^2 + 21,722x + 14,036$	0,89	1,87
Caseína	$\hat{y} = 1,096x^2 - 3,6461x + 5,208$	0,73	8,27
Dextrina	$\hat{y} = 8,5959x + 5,4674$	0,63	5,18
NH-AV	$\hat{y} = 4,159x + 16,117$	0,72	8,16
NH-E1000	$\hat{y} = -1,822x^2 + 24,978x + 15,672$	0,68	1,55
Oxibenzona	-	NS	-

^a Coeficiente de determinação para a equação de regressão. ^b Dose mínima para alcançar 50% da culturabilidade relativa (% m/v).

Conclusões

Os isolados L7K e L10 apresentaram elevada suscetibilidade à radiação UV-B, com baixa recuperação de células viáveis, mesmo nas doses mais baixas de radiação.

NH-E1000 e amido em doses inferiores a 2% m/v apresentaram a melhor proteção contra a radiação UV-B, permitindo a recuperação de células viáveis maior que 50%.

Referências

BAUTISTA-ROSALES, P. U. CALDERON-SANTOYO, M.; SERVIN-VILLEGAS, R.; OCHOA-ALVAREZ, N. A.; RAGAZZOSANCHEZ, J. A. Action mechanisms of the yeast *Meyerozyma caribbica* for the control of the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides* in mangoes. **Biological Control**, New York, v. 65, n. 3, p. 293-301, 2013.

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

BURGESS, T. I.; BARBER P. A.; MOHALI S.; PEGG G.; BEER W.; WINGFIELD M. J. Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology. **Mycologia**, Stanford, v. 98, n. 3, p. 423-435, 2006.

EDGINGTON, S.; SEGURA, H.; LA ROSA, W. WILLIAMS, T. Photoprotection of *Beauveria bassiana*: Testing simple formulations for control of the coffee berry borer. **International Journal of Pest Management**, London, v. 46, n. 3, p. 169-176, 2000.

MENEZES, H. D. de, MASSOLA JÚNIOR, N. S., FLINT, S. D., SILVA, G. J. DA, BACHMANN, L., RANGEL, D. E. N., BRAGA, G. U. L. Growth under visible light increases Conidia and Mucilage production and tolerance to UV-B radiation in the plant-pathogenic fungus *Colletotrichum acutatum*. **Photochemistry and Photobiology**, London, v. 12, p. 68-75, 2014.

SÁBER, M. L. **Efeito da radiação ultravioleta B sobre a comunidade bacteriana epifítica de soja** (*Glycine max* L. Merrill). 2010, 87 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). ESALQ - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

SNOWDON, A. **A color atlas of post-harvest disease and disorders of fruits and vegetables. Vol. 1: General introduction and fruits**. Londres: Manson Publishing, 2010. 302 p.

VIRET, O.; KELLER, M.; JAUDZEMS, V. G.; COLE, F. M. *Botrytis cinerea* infection of grape flowers: light and electron microscopical studies of infection sites. **Phytopathology**, St. Paul, v. 94, p. 850-857, 2004.

GAO, Q.; GARCIA-PICHEL, F. Microbial ultraviolet sunscreens. **Nature Reviews Microbiology**, New York, v. 9, p. 791-802, 2011