

Efeito da Temperatura e Disponibilidade de Água sobre Leveduras Aplicadas no Controle de Podridões Pós-colheita em Uva

Effect of Temperature and Water Availability on Yeasts Applied to Control Post-harvest Decay of Grapes

Carliana Araújo¹; Ítala Layanne Alves²; Thalita Freitas²; Ana Paula Carvalho¹; Paulo Ivan Fernandes Júnior³; Carlos Alberto Tuão Gava³

Abstract

Biocontrol became an alternative to control of post-harvest decay of grape, however due to the minimal handling in the packing-houses its application is limited to field. Therefore, biocontrol agents tolerance to climate must be included in its selection process, mainly considering climate changes impact on temperature and humidity. In this work we evaluated the yeast isolates L9, L7K, LF e L10, which were previously selected for control of post-harvest decay of grapes, were evaluate about natural tolerance to temperature and water potential. In the first experiment, isolates were incubated in growth chamber in temperature range from 20 to 40 °C. All isolates showed tolerance to 30 °C and negligible growth from 35 °C onward. In the second experiment, the isolates were inoculated in culture media added with polyethylene glycol 6000 in order to achieve osmotic potential from 0 to -20 MPa. Isolate L10 showed highest resistance to osmolite addition, maintaining a high cell number up to -5 MPa. The other isolates showed growth reduction even from the lowest osmolite concentration. In the third experiment, isolate L10 was grown under condition of low water potential and increasing temperature. Results showed that variables evaluated showed an additive effect strongly reducing its growth.

Key-words: biological control, *Vitis vinifera*, osmotic potential.

Introdução

O controle biológico utilizando-se antagonistas microbianos tem emergido como uma abordagem promissora para o controle de podridões, seja aplicado isoladamente ou como parte de uma estratégia de controle integrado para reduzir o uso de fungicidas sintéticos (FRAVEL, 2005). Entre as alternativas propostas para o controle biológico, as leveduras destacam-se como potenciais agentes de biocontrole. As leveduras ocorrem naturalmente sobre a superfície de frutos e têm sido eficazes como agentes de controle biológico (NALLY et al., 2013) e possuem vários mecanismos de ação como a competição por nutrientes e espaço, a antibiose, a produção de enzimas hidrolíticas, parasitismo, formação de biofilme e indução de resistência em plantas (LUTZ et al., 2013).

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

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

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

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

A aplicação pré-colheita de agentes de controle biológico permite que o antagonista tenha mais interação com o agente patogênico e colonizem tecidos antes da chegada do patógeno e, no caso da videira, torna-se a única opção, já que os cachos sofrem pouca ou nenhuma manipulação pós-colheita. 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 de variáveis climáticas como UV, temperatura e UR. A tolerância às condições ambientais desfavoráveis torna-se, então, uma característica importante na seleção de agentes microbianos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar isolados de levedura quanto à tolerância à dessecação (baixo potencial osmótico) e temperatura que, em estudos anteriores, apresentaram potencial para o controle de patógenos pós-colheita em uva.

Material e Métodos

Os isolados de leveduras LF, L9, L7K L60K, L7, L8, L3A e L10 utilizados nos experimentos foram obtidos a partir de isolamento de frutas cultivadas no Submédio São Francisco e são mantidos na coleção de micro-organismos do Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Semiárido.

No início dos estudos, as leveduras foram cultivadas em meio de cultura líquido SD-Y (Peptona 2,0%, extrato de levedura 1,0% m/v) em agitador orbital a 120 rpm por 72 horas, a 27 °C e fotoperíodo de 12 horas. Após o período de crescimento, o caldo de cultivo foi centrifugado a 5.000 rpm por 5 minutos, e ressuscitado em NaCl 0,8% (m/v) por duas vezes para a eliminação de resíduos do meio de cultura. Em seguida, foi retirada uma alíquota de 100 µl da suspensão e diluída em água estéril (1:10 v/v) para a contagem em câmara de Neubauer. As suspensões foram padronizadas a 10^8 céls.mL⁻¹.

A avaliação da tolerância à baixo potencial osmótico (PO) foi realizada pelo cultivo dos isolados em meio de cultura em um gradiente de concentrações de Polietilenoglicol (PEG) 6000: 0, 119,6 g/L, 202,2 g/L, 295,7 g/L, 380,53 g/L e 428,38 g/L, equivalentes aos potenciais osmóticos de 0 MPa, -2 MPa, -5 MPa, -10 MPa, -15 MPa, -20 MPa. As diferentes massas de PEG 6000 foram adicionadas a meio BSM+Y (basal salt medium) (Glucose 30 g/L, K₂HPO₄ 1,0 g L⁻¹, KCl 0,5 g L⁻¹, MgSO₄.7H₂O 0,5 g L⁻¹, NaNO₃ 3,0 g L⁻¹, FeSO₄.7H₂O 0,01 g L⁻¹, extrato de levedura 5,0 g L⁻¹). Em seguida, os frascos contendo o meio de cultivo foram inoculados com suspensões de leveduras de forma a alcançar 10⁸ céls.mL⁻¹.

No segundo experimento, após a inoculação em meio BSM+Y, os isolados L7K, L9, L10 e LF foram incubados em estufa BOD com diferentes temperaturas: 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C e 40 °C. O período de crescimento foi de 72 horas para os isolados, exceto para LF, que foi incubado por 96 horas, já que seu crescimento é mais lento. O experimento foi realizado em duplicata, os dados obtidos transformados em log₁₀; a avaliação do crescimento das leveduras foi realizada em contagem em câmara de Neubauer.

Em um terceiro experimento, o isolado L10 foi exposto a condições com variação de temperatura e potencial osmótico pelo cultivo em meio BSM+Y, conforme descrito anteriormente.

Resultados e Discussão

De modo geral, os isolados L10, L7K e LF apresentaram faixa ótima de crescimento em torno de 25 °C a 30 °C, tolerando até 35 °C e decaindo rapidamente até 40 °C. Já o isolado L9 apresentou crescimento ótimo em torno 20 °C e o mais rápido crescimento nas condições de cultivo. No entanto, apresentou redução do número de células viáveis em temperaturas superiores a 30 °C (Figura 1a). De forma similar, os isolados apresentaram diferentes comportamentos quando cultivados em meio com diferentes aW à temperatura de 25 °C (Figura 1b).

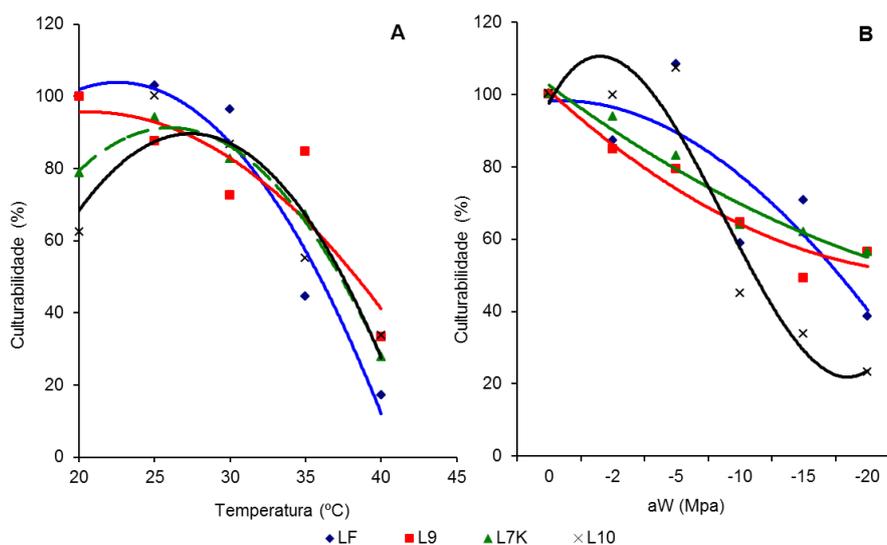


Figura 1. Avaliação da tolerância dos isolados de leveduras LF, L7K, L9 e L10 a estresses abióticos em meio de cultivo com diferentes condições de temperatura (a) e diferentes potenciais hídricos do meio (b).

O isolado L10 apresentou elevado número de unidades formadoras de colônias (UFC) até -5 Mpa e redução da contagem a potencial osmótico (PO) mais baixos. Os isolados LF e L7K sofreram redução constante do número de UFC a partir das primeiras alterações no potencial osmótico do meio. O isolado L9, apesar de obter maior crescimento em meio de cultivo, também apresentou rápida diminuição no número de UFC com o aumento da concentração do osmólito e, conseqüente, queda da atividade de água do meio (aW).

Resultados similares foram observados por Sperandio (2012) ao avaliar isolados de leveduras para o controle de podridão causada por *Penicillium digitatum* em laranja. Wang et al. (2008) relataram que a levedura *Rhodosporidium paludigenum* conseguiu inibir a atuação do patógeno *A. alternata* em tomate-cereja (*Lycopersicon esculentum* Mill) apresentando melhor tratamento com incidência de apenas 13%. Em estudos posteriores, o mesmo grupo relatou que cinco isolados de leveduras avaliadas para o controle do mofo-cinza (*Botrytis cinerea*) em trabalho similar a este, reduziram significativamente a incidência de podridões em tomates-cereja (WANG et al., 2010).

A avaliação da tolerância a estresses múltiplos (Figura 2) mostrou efeito significativo da interação das variáveis temperatura e disponibilidade de água no meio (PO) sobre o crescimento do isolado L10. De modo geral, apesar da maior tolerância de L10 às variáveis quando testadas isoladamente, verificou-se que

com o aumento da temperatura houve redução da tolerância ao potencial osmótico. Embora hajam poucos estudos relativos ao efeito da combinação de fatores abióticos sobre a sobrevivência e crescimento microbiano, a interação desses fatores altera o funcionamento de macromoléculas e organelas, provavelmente em função de uma possível alteração da permeabilidade das membranas e a insuficiência dos mecanismos de reparo existentes (FOLCH-MALLOL et al., 2004).

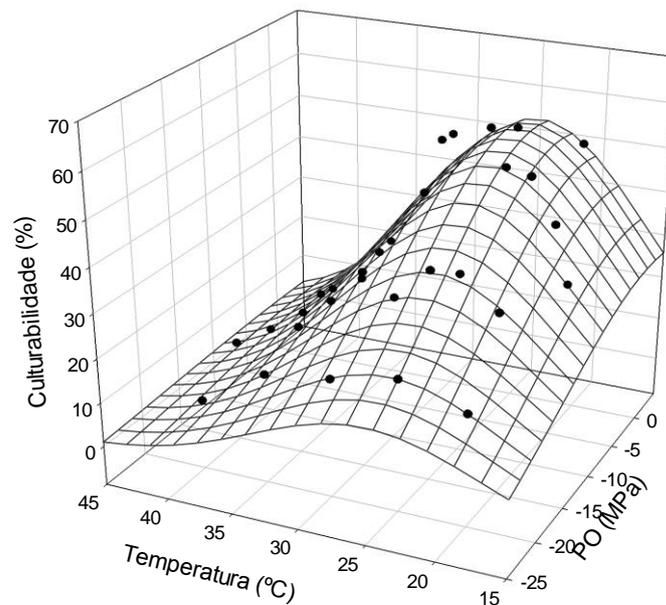


Figura 2. Culturabilidade relativa dos isolados L10 em condições de cultivo variando a temperatura e o potencial osmótico do meio. O termo culturabilidade relativa refere-se ao número de colônias obtidas a partir da contagem de células viáveis para cada combinação de tratamentos em comparação a um tratamento controle a 25 °C.

Os cenários desenhados a partir das mudanças climáticas globais em curso indicam que as condições de temperatura e disponibilidade de água, seja esta a umidade relativa do ar (UR) e a pluviosidade, serão afetadas significativamente. Nas condições atuais, a radiação UV, a UR e a temperatura já interferem significativamente na eficiência de controle de agentes microbianos aplicados em campo.

Até o momento, são poucos os estudos a respeito da interação entre as alterações climáticas estimadas sobre a eficiência de agentes de controle biológico e a dinâmica do crescimento das populações microbianas associadas às plantas (SÁBER, 2010), e menos ainda os estudos envolvendo a interação entre diferentes variáveis climáticas. No entanto, os micro-organismos possuem um conjunto de mecanismos de tolerância que poderão resultar na colonização de superfícies das bagas de videira pelos agentes de controle após sua aplicação em campo. O isolado L10, por exemplo, apresentou a formação de flocos em condições de baixo PO, característica anteriormente relatada para *Zygosaccharomyces rouxii*, e controlada por uma família de genes denominada FLO (WATANABE et al., 2013).

Conclusões

Os isolados L9, L7K, LF e L10 mostraram tolerância até a temperatura de 30 °C, com rápido decréscimo a partir da temperatura de 35 °C.

O isolado L10 mostrou maior tolerância ao baixo potencial osmótico do meio, mantendo número de células viáveis elevado até -5 Mpa, enquanto os demais apresentaram redução do número de células viáveis mesmo nas concentrações mais baixas do osmólito.

O crescimento do isolado L10 foi reduzido em condições de estresse conjunto de temperatura e baixo potencial osmótico no meio de cultivo, com redução da tolerância à baixa disponibilidade de água com o aumento da temperatura.

Referências

- FOLCH-MALLOL, J. L.; GARAY-ARROYO, A.; LLEDÍAS, F.; ROBLES, A. A. C. La respuesta a estrés em la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, México, v. 46, p. 24-46, 2004.
- FRAVEL, D. R. Commercialization and implementation of biocontrol. **Annual Review of Plant Biology**, St. Paul, v. 43, p. 337-359, 2005.
- LUTZ, M. C.; LOPES, C. A.; RODRIGUEZ, M. E.; SOSA, M. C.; SANGORRIN, M. P. Efficacy and putative mode of action of native and commercial antagonistic yeasts against postharvest pathogens of pear. **International Journal of Food Microbiology**, New York, v. 164, p. 166-172, 2013.
- NALLY, M. C.; PESCE, V. M.; MATURANO, Y. P.; TORO, M. E.; COMBINA, M.; CASTELLANOS DE FIGUEIROA, L. I.; VAZQUEZ, F. Biocontrol of fungi isolated from sour rot infected table grapes by *Saccharomyces* and other yeast species. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 86, p. 456-462, 2013.
- SÁBER, M. L. **Efeito da radiação ultravioleta B sobre a comunidade bacteriana epifítica de soja (*Glycine max* L. Merrill)**. 2010. 87 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – 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. London: Manson Publishing, 2010. 302 p.
- SPERANDIO, E. M. **Ocorrência, diversidade e potencial biotecnológico de leveduras associadas a plantas do Cerrado**. 2012. 90 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.
- 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.
- WANG, Y.; BAO, Y.; SHEN, D.; FENG, W.; YU, T.; ZHANG, J.; ZHENG, X.D. Biocontrol of *Alternaria alternata* on cherry tomato fruit by use of marine yeast *Rhodospiridium paludigenum* Fell & Tallman. **International Journal of Food Microbiology**, New York, v. 123, p. 234-239, 2008.
- WANG, Y.; WANG, P.; XIA, J.; YU, T.; LOU, B.; WANG, J. ZHENG, X.D. Effect of water activity on stress tolerance and biocontrol activity in antagonistic yeast *Rhodospiridium paludigenum*. **International Journal of Food Microbiology**, New York, v. 143, p. 103-108, 2010.
- WATANABE, J.; UEHARA, K.; MOGI, Y. Adaptation of the osmotolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* to an osmotic environment through copy number amplification of FLO11D. **Genetics**, Bethesda, v. 49, p. 122-135, 2013.