

Métodos Utilizados no Biocontrole de Fitopatógenos

Metodos usados no ...

2007

LV-2008.00018



CNPMA-7500-2



Embrapa



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Uva e Vinho
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Métodos usados no Biocontrole de Fitopatógenos

Editores:

Rosa Maria Valdebenito Sanhueza
Itamar Soares de Melo

Bento Gonçalves, RS
2007

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Uva e Vinho

Rua Livramento, 515

Caixa Postal 130

Fone: (0xx)54 3455 8000

Fax: (0xx)54 3451 2792

<http://www.cnpuv.embrapa.br>

sac@cnpuv.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Lucas da Ressurreição Garrido*

Secretária-Executiva: *Sandra de Souza Sebben*

Membros: *Luiz Antenor Rizzon, Kátia Midori Hiwatashi, Osmar Nickel,*

Viviane Maria Zanella Bello Fialho

Normalização bibliográfica: *Kátia Midori Hiwatashi*

Elaboração da capa: *Luciana Elena Mendonça Prado*

1ª edição

1ª impressão (2007): 500 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Uva e Vinho

Métodos usados no biocontrole de fitopatógenos/Editado por Rosa Maria Valdebenito Sanhueza e Itamar Soares de Melo. – Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2007.

141 p.

ISBN 978-85-89921-05-3

1. Doença de planta. 2. Antagonismo. 3. Microrganismo. I. Valdebenito Sanhueza, Rosa Maria, ed. II. Melo, Itamar Soares de, ed.

CDD 579 (21. Ed.)

© Embrapa, 2007

Apresentação

Em consonância com a missão institucional da Embrapa Uva e Vinho, desde longa data vêm sendo desenvolvidas ações de pesquisa e desenvolvimento que têm gerado importantes resultados no tocante ao componente ambiental. E isto ocorre porque é comprovada a necessidade de buscar-se o desenvolvimento sustentado do espaço rural, tendo-se em vista as exigências de mercado, dos produtores e dos órgãos ambientais em reduzir-se o impacto ambiental da atividade produtiva.

É neste contexto que o controle biológico se insere. Ao maximizar o uso de organismos naturais no manejo de pragas e doenças, esta tecnologia contribui decisivamente para que a produção se dê com reduzido impacto, em benefício da almejada sustentabilidade. Esta publicação é resultante de estudos de pesquisadores da Embrapa Uva e Vinho e de outras Unidades da Embrapa, além de essenciais parceiros, os quais, em parceria, têm contribuído para a melhoria do conhecimento sobre esta importante área.

Temos certeza que as informações aqui divulgadas servirão para o maior conhecimento e uso do controle biológico, bem como de estímulo e suporte para novas ações de pesquisa que resultem em tecnologias ambientalmente limpas e tecnicamente viáveis.

Alexandre Hoffmann
Chefe-Geral
Embrapa Uva e Vinho

Sumário

Isolamento de antagonistas a patógenos que colonizam ferimentos de plantas <i>Rosa Maria Valdebenito Sanhueza e Itamar Soares de Melo</i>	9
Obtenção de epífitas de frutos e seleção de antagonistas no controle de podridões de pós-colheita <i>Rosa Maria Valdebenito Sanhueza e Itamar Soares de Melo</i>	13
Isolamento de colonizadores de clamidosporos de <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Itamar Soares de Melo e Rosa Maria Valdebenito Sanhueza</i>	17
Isolamento de bactérias do rizoplano e endorizosfera e seu efeito na colonização de raízes e na promoção do crescimento de plantas <i>Itamar Soares de Melo e Rosa Maria Valdebenito Sanhueza</i>	21
Isolamento de antagonistas para controle de doenças vasculares <i>Rosa Maria Valdebenito Sanhueza e Itamar Soares de Melo</i>	27
Avaliação do efeito protetor e curativo de antagonistas a patógenos que colonizam folhas <i>Rosa Maria Valdebenito Sanhueza, Margareth Zamboni-Pinotti e Ana Elisa Silveira Perez</i>	31
Multiplicação de <i>Clonostachys rosea</i> <i>Rosa Maria Valdebenito Sanhueza e Gilberto Dall Onder</i>	35
Seleção de fungos endofíticos em fruteiras e flores <i>Rosa Maria Valdebenito Sanhueza e Margareth Zamboni-Pinotti</i> ...	39
Isolamento seletivo de bactérias ativas para nucleação de gelo <i>Itamar Soares de Melo e Rosa Maria Valdebenito Sanhueza</i>	43

Isolamento de fungos micorrízicos	
<i>Itamar Soares de Melo e Rosa Maria Valdebenito Sanhueza</i>	45
Isolamento seletivo de <i>Bacillus</i>	
<i>Wagner Bettiol</i>	49
Obtenção de mutantes e competitividade de isolados de bactérias resistentes a antibióticos	
<i>Itamar Soares de Melo e Rosa Maria Valdebenito Sanhueza</i>	53
Obtenção de mutantes de <i>Trichoderma</i> spp. resistentes a fungicidas	
<i>Itamar Soares de Melo e Rosa Maria Valdebenito Sanhueza</i>	55
Identificação de bactérias por análise dos ácidos graxos	
<i>Itamar Soares de Melo e Rosa Maria Valdebenito Sanhueza</i>	59
Identificação de bactérias pelo sequenciamento de genes 16S ribossômico (16S rDNA)	
<i>Fernando Dini Andreote</i>	67
Identificação e diferenciação de linhagens de leveduras antagônicas a fitopatógenos utilizando sondas convencionais como indicadores na reação de polimerização em cadeia	
<i>Luis Fernando Revers e Rosa Maria Valdebenito Sanhueza</i>	75
Produção de sideróforos por rizobactérias	
<i>Itamar Soares de Melo e Rosa Maria Valdebenito Sanhueza</i>	79
Produção de antibióticos por microrganismos	
<i>Rosa T. S. Frighetto e Itamar Soares de Melo</i>	83

Produção de bactérias para uso no controle biológico	
<i>Deise Maria Fontana Capalbo</i>	97
Encapsulamento de microrganismos	
<i>Rosa Maria Valdebenito Sanhueza e Itamar Soares de Melo</i>	103
Roteiro para formulação experimental pó molhável de biopesticida (sigla internacional WP)	
<i>Cláudia Medugno</i>	109
Isolamento de actinomicetos visando ao controle biológico de fitopatógenos	
<i>Joelma Marcon, Jose Antonio da Silva e Maria Carolina Quecine</i> ...	117
Avaliação <i>in vitro</i> da colonização de raízes por rizobactérias	
<i>Brígida P. Vilar Queiroz e Itamar Soares de Melo</i>	121
Seleção de rizobactérias capazes de formarem biofilmes	
<i>Francisco Eduardo de C. Costa e Itamar Soares de Melo</i>	125
Avaliação ecotoxicológica de microrganismos em organismos não-alvo, organismos aquáticos e mamíferos	
<i>Vera Lúcia de Castro e Cláudio Jonsson</i>	129
Apêndice	
Meios de Cultura e Soluções	137

Isolamento de antagonistas a patógenos que colonizam ferimentos de plantas

Rosa Maria Valdebenito Sanhueza ¹
Itamar Soares de Melo ²

Plantas que sofrem tratos culturais constituídos por cortes de ramos ou remoção dos brotos, apresentam tecidos expostos suscetíveis de serem colonizados por microrganismos. Nos cortes provocados, quando a cicatrização for demorada, os nutrientes disponíveis pela destruição dos tecidos constituem substrato para a multiplicação e colonização do setor por microrganismos. A velocidade de crescimento, a eficiência na multiplicação, a disponibilidade de nutrientes e a produção de metabólitos tóxicos a outros organismos serão fatores de vantagens para os colonizadores iniciais.

Os patógenos que iniciam a infecção nos ferimentos das plantas podem colonizar ramos de um ou mais anos, como por exemplo, *Botryosphaeria* spp., enquanto outros estabelecem-se em cortes de ramos de dois ou mais anos, como *Chodrostereum purpurem*. Condições de estresse nas plantas podem acelerar os prejuízos provocados pela infecção por estes patógenos.

O controle proposto para estes patógenos se faz pela proteção das feridas com misturas de fungicidas, com géis, tinta vinílica, ou com aplicação de organismos colonizadores e antagonísticos aos patógenos que atacam essas plantas. Esta última abordagem de controle tem vantagens quando comparada com os fungicidas por apresentar maior efeito residual. Os organismos se estabelecem nos tecidos e não há grandes riscos de seleção de estirpes resistentes aos patógenos. Por outro lado, a proteção com tinta vinílica ou similares apresenta a desvantagem de se rachar pelo efeito do sol e falta de umidade, permitindo a exposição dos tecidos à ação de organismos patogênicos.

A seleção de organismos colonizadores de ferimentos nas plantas poderá ser feita principalmente, a partir dos tecidos necrosados, selecionando-se colonizadores adaptados a esse local e ambiente e, dentre eles, os que apresentarem maior efeito inibitório ao patógeno. Evidentemente, outros antagonistas eficientes para o controle de outros patógenos poderão também ser avaliados no processo de seleção.

¹ Eng. Agrôn., Doutor, Embrapa Uva e Vinho, Caixa Postal 130, 95700-000 Bento Gonçalves, RS.

² Eng. Agrôn., Doutor, Embrapa Meio Ambiente, Caixa Postal 69, 13820-000 Jaguariúna, SP.

Objetivo

Obter organismos colonizadores de ferimentos de plantas para proteção contra infecção por patógenos.

Protocolo

1. Colher tecido onde foi feita a poda ou outro tipo de ferimento em 10 plantas localizadas em área afetada pelo patógeno que se pretende controlar. As amostragens podem ser feitas em ramos de um, dois e três anos, coletando-se cinco ramos por planta.
2. Cada amostra deve ser desinfestada na epiderme do ramo com algodão embebido em álcool 80°. A seguir, assepticamente, dividir cada material em pequenos pedaços e colocar em BDA* e ágar extrato de malte, com e sem 50 ppm de estreptomicina. Deixar as placas de Petri em estufa, no escuro, 21° a 24°C. Transferir e purificar os organismos desenvolvidos. No caso de fungos, recomenda-se fazer a purificação de cada isolado, repicando-se pontas de hifas morfológicamente diferentes, após 24 a 48 horas de permanência do material em estufa. Este trabalho deverá ser feito com auxílio de microscópio estereoscópico com luz transmitida e de uma microespátula que corte o meio de cultura contendo somente a ponta da hifa selecionada. Para selecionar e purificar bactérias, coloca-se 0,1 mL de água esterilizada em um extremo de uma placa com BDA e após encostar a ponta de um estilete na colônia bacteriana desenvolvida, agita-se suavemente na água colocada na placa. A partir dessa suspensão risca-se a placa em um sentido, esteriliza-se a agulha e a seguir são feitas as riscagens perpendiculares à primeira. Somente as colônias isoladas de bactérias e de fungos podem então ser caracterizadas e avaliadas quanto a antagonismo.
3. Produção de propágulos do patógeno: induzir a frutificação do patógeno utilizando celofane ou papel de filtro esterilizado sobre meios de cultura tais como: ágar extrato de malte, ágar farinha de aveia ou ágar-suco V8. Para acelerar a produção de frutificação, se possível, transferir suspensões de esporos aos meios e manter as culturas sob iluminação contínua.
4. Determinar a concentração de inóculo e condições ideais do ambiente para induzir altos níveis de infecção no hospedeiro.

* Ver apêndice para composição de meios de cultura.

5. Fazer a primeira triagem de antagonistas em ramos destacados das plantas hospedeiras de um ou dois anos. Utilizar 3 a 4 ramos esterilizados superficialmente de 15 a 20 cm, mantendo a parte inferior imersa em água esterilizada. Podar o extremo superior e umedecer o local com suspensões bacterianas com 71% de transmitência a 560 nm (T) ou nível 3 da escala de McFarland. Para fungos, utilizar concentrações de 10^6 esporos/mL ou discos de micélio em crescimento. Cobrir o local tratado com parafilme ou algodão úmido e proteger os extremos tratados dos ramos com um saco de polietileno. Após 12 ou 24 horas, inocular os ferimentos e os ramos testemunhas utilizando-se as concentrações adequadas para cada patógeno. Proteger novamente os extremos dos ramos e mantê-los ensacados de 7 a 14 dias, até o surgimento dos sintomas.
6. Na avaliação, é necessário medir o tamanho da lesão e fazer o reisolamento do patógeno de cada ramo. Os isolados mais promissores poderão ser reavaliados, estudando-se menores intervalos entre a proteção do antagonista, a inoculação do patógeno e o efeito curativo. Neste último caso, o primeiro tratamento será feito com suspensões do patógeno e a seguir, em intervalos seriados (2, 4, 8, 12, 24 horas) serão utilizados os antagonistas.
7. Os três isolados mais eficientes poderão ser testados no campo isoladamente ou em mistura em suspensões aquosas com óleos ou géis, e comparados com o método de controle químico recomendado.

Literatura Consultada

CORKE, A. T. K.; HUNTER, T. Biocontrol of *Nectria galligena* infection of pruning wounds on apple shoots. **Journal of Horticultural Science**, v. 54, n. 1, p. 47-55, 1979.

GINDRA, T. D. Biocontrol of plant diseases by inoculation of fresh wounds, seeds and soil with antagonists. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 3.; INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SOIL-BORNE PLANT PATHOGENS, 4., 1978, München, Federal Republic of Germany. Soilborne plant pathogens: proceedings... London: Academic Press, 1979. 685 p.

GROSCLAUDE, C.; RICARD, J.; DUBOS, B. Inoculation of *Trichoderma viride* spores via pruning shears for biological control of *Stereum purpureum* on plum tree wounds. **Plant Disease Reporter**, v. 57, n. 1, p. 25-28, 1973.

PAPAVZAS, G. C. *Trichodermae Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**, v. 23, p. 23-54, 1985.