

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 colonizadores de clamidosporos de *Fusarium oxysporum*

Itamar Soares de Melo ¹

Rosa Maria Valdebenito Sanhueza ²

Fusarium oxysporum é um fungo de solo com várias "formas specialis" que causam murcha em diversas espécies de plantas. É muito difícil controlar esse fungo devido à sobrevivência no solo, principalmente na forma de clamidosporos.

A ocorrência de microrganismos associados aos clamidosporos já foi demonstrada (TOYOTA; KIMURA, 1991). Tais microrganismos podem ser de considerável importância como agentes potenciais de biocontrole.

Objetivo

Isolar microrganismos associados aos clamidosporos de *F. oxysporum* e investigar o efeito desses microrganismos sobre o crescimento do patógeno.

Protocolo

Parte I - Isolamento de bactérias

1. Produzir microconídios de *F. oxysporum* em meio líquido, sob agitação (80-100 rpm) por, aproximadamente, oito dias.
2. Coletar os microconídios sob algodão absorvente e lavá-los em água destilada.
3. Coletar microconídios em um filtro millipore com uma abertura de 0,8 µm, numa quantidade de 10⁴-10⁵ microconídios/filtro.
4. Deixar os filtros flutuando sobre a superfície de água destilada por 24 horas a 28°C, a fim de que os microconídios germinem.

¹ Eng. Agrôn., Doutor, Embrapa Meio Ambiente, Caixa Postal 69, 13820-000 Jaguariúna, SP.

² Eng. Agrôn., Doutor, Embrapa Uva e Vinho, Caixa Postal 130, 95700-000 Bento Gonçalves, RS.

5. Colocar cerca de 2-4 g de solo natural numa placa de Petri esterilizada. Umedecer o solo com água destilada em quantidade suficiente para que o mesmo fique pastoso (o solo não deve, neste caso, ser argiloso).
6. Os filtros millipore com os microconídios germinando são colocados sobre o solo, nas placas de Petri, tampadas em seguida.
7. Incubar as culturas por aproximadamente 12 dias (observar a presença de clamidosporos).
8. Proceder ao isolamento de bactérias colonizando os clamidosporos, seguindo as etapas seguintes:
 - 8.1. lavar completamente com água destilada o lado do filtro em contato com o solo;
 - 8.2. coletar os clamidosporos sobre os filtros em uma solução de NaCl 0,7%;
 - 8.3. submeter a solução à sonificação por, aproximadamente, 1 minuto;
 - 8.4. filtrar a solução em millipore de 2,0 μm ;
 - 8.5. fazer diluições em série do filtrado e plaquear em nutriente ágar;
 - 8.6. incubar as culturas e observar periodicamente o crescimento de colônias bacterianas que deverão ser purificadas e identificadas.

Parte II - Efeito das bactérias sobre o crescimento de *F. oxysporum*

1. Coletar microconídios de *F. oxysporum* sobre um filtro millipore de 0,2 μm .
2. Deixar flutuar em solução salina 0,85% os filtros contendo os microconídios por 24 horas.
3. Inocular cada isolado bacteriano identificado nos filtros.
4. Incubar as culturas sobre solo umedecido, a 28°C, por aproximadamente sete dias.

5. Após a incubação, retirar os filtros das placas, lavar a parte da membrana em contato com o solo com água destilada e dividir os filtros em partes, onde uma parte é corada com rosa bengala para avaliar o número de esporos. As outras partes do filtro são transferidas para água destilada ou meio batata-dextrose-diluído.
6. Após 8-10 horas de incubação adicional, a germinação dos esporos é avaliada por observação dos tubos germinativos.

Referência Bibliográfica

TOYOTA, K.; KIMURA, M. Bacteria adsorbing on the chlamidospores of *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*. **Japanese Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 62, p. 533-535, 1991.