

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 seletivo de bactérias ativas para nucleação de gelo

Itamar Soares de Melo ¹

Rosa Maria Valdebenito Sanhuesa ²

Bactérias ativas para nucleação de gelo (INA⁺) têm sido reportadas como sendo responsáveis por danos causados por geadas em várias culturas sensíveis. Algumas já foram previamente descritas, como: patovares de *Pseudomonas syringae*, *P. fluorescens*., *P. viridiflava*, *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* e *Erwinia herbicola*. Estas bactérias INA⁺ têm sido isoladas de plantas ou partes de plantas com ou sem injúria causada por geadas. Segundo Lindow (1985) de 0,02% a 20% do total de bactérias encontradas na comunidade microbiana do filoplano são nucleadoras ativas de gelo e estão diretamente envolvidas em danos causados por geadas em plantas em temperatura de aproximadamente -1°C. No entanto, algumas estirpes de *E. herbicola* e *P. syringae* são negativas para nucleação, ditas INA⁻ e como estas bactérias colonizam o filoplano das plantas, tem-se sugerido substituí-las em estádios fenológicos com o propósito de controlar biologicamente as bactérias INA⁺. Algumas estirpes, como a M232A de *E. herbicola* não catalizam a cristalização ou solidificação da água a temperaturas baixas e são antagônicas a patovares INA⁺ de *P. syringae* e *E. herbicola*.

Objetivo

Identificar bactérias INA⁺ isoladas de folhas danificadas por geadas.

Protocolo

1. Coletar folhas de fruteiras, de brócolis, nabo ou milho durante a manhã quando a temperatura estiver a -2°C.
2. Cortar imediatamente as folhas em pedaços de 2 x 2 cm. Colocá-las em tubos contendo 10 mL de água destilada esterilizada. Agitar por minutos e filtrar.
3. Pulverizar o lavado em placas contendo ágar-nutritivo.

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.

4. Após três dias, separar e repicar colônias ao acaso.
5. Cultivá-las, em meios contendo poliálcoois (glicerol, manitol, sorbitol, etc.) ou meio KB, incubando-as individualmente, por mais três dias, à temperatura que não ultrapasse 24°C.
6. Proceder seleção para nucleação de gelo a -10°C. Tal atividade é determinada pelo método do congelamento de gotículas sobre papel de alumínio impregnado com cera ou parafina, à temperatura de -5°C a -10°C. Aproximadamente 30-50 gotas de 50 µL de cada cultura bacteriana, desenvolvida em meio nutriente líquido são pipetadas sobre a folha de alumínio flutuante em etanol frio.
7. Submeter a teste de congelamento. Se todas as gotas congelarem dentro de 30 segundos, as linhagens bacterianas serão consideradas ativas para nucleação de gelo.
8. Para comprovar o efeito destas linhagens in vivo, deve-se proceder à inoculação de folhas de plântulas de milho, desenvolvidas em solo esterilizado e mantidas em câmara de crescimento.
9. Após a inoculação, manter as plântulas a temperatura de -1°C
10. Avaliar os danos nas folhas causados pelo super-resfriamento. O tratamento controle receberá somente água esterilizada.

Literatura Consultada

LINDOW, S. E. The role of bacterial ice nucleation in frost injury to plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 21, p. 363-384, 1983.

LINDOW, S. E. Integrated control and role of antibiosis in biological control of fire blight and frost injury. In: WINDELS, C. E.; LINDOW, S. E. (Ed.). **Biological control of the Phylloplane**. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1985. p. 83-115. (Symposium book, n. 3). Proceedings of a symposium held at the Annual Meeting of the American Phytopathological Society and the Canadian Phytopathological Society, University of Guelph, 1984.

HIRANO, S. S.; BAKER, L. S.; UPPER, C. D. Ice nucleation temperature of individual leaves in relation to population sizes of ice nucleations active bacteria and frost injury. **Plant Physiology**, v. 77, n. 2, p. 259-265, 1985.