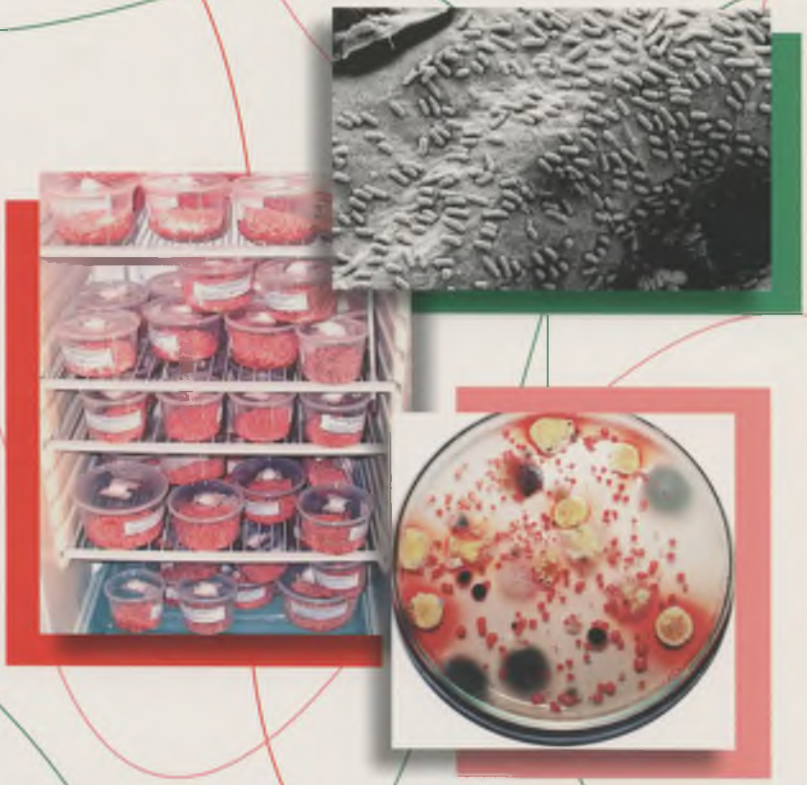
Métodos Utilizados no Biocontrole de Fitopatógenos

Metodos usados no ...
2007 LV-2008.00018
CNPMA-7500-2



Embrapa

18.00018

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
Rosa Maria Valdebenito Sanhueza e Itamar Soares de Melo 9

Obtenção de epífitas de frutos e seleção de antagonistas no controle de podridões de pós-colheita
Rosa Maria Valdebenito Sanhueza e Itamar Soares de Melo 13

Isolamento de colonizadores de clamidosporos de *Fusarium oxysporum*
Itamar Soares de Melo e Rosa Maria Valdebenito Sanhueza 17

Isolamento de bactérias do rizoplano e endorizosfera e seu efeito na colonização de raízes e na promoção do crescimento de plantas
Itamar Soares de Melo e Rosa Maria Valdebenito Sanhueza 21

Isolamento de antagonistas para controle de doenças vasculares
Rosa Maria Valdebenito Sanhueza e Itamar Soares de Melo 27

Avaliação do efeito protetor e curativo de antagonistas a patógenos que colonizam folhas
Rosa Maria Valdebenito Sanhueza, Margareth Zamboni-Pinotti e Ana Elisa Silveira Perez 31

Multiplicação de *Clonostachys rosea*
Rosa Maria Valdebenito Sanhueza e Gilberto Dall'Onder 35

Seleção de fungos endofíticos em fruteiras e flores
Rosa Maria Valdebenito Sanhueza e Margareth Zamboni-Pinoti ... 39

Isolamento seletivo de bactérias ativas para nucleação de gelo
Itamar Soares de Melo e Rosa Maria Valdebenito Sanhueza 43

Isolamento de fungos micorrízicos
Itamar Soares de Melo e Rosa Maria Valdebenito Sanhueza 45

Isolamento seletivo de *Bacillus*
Wagner Bettiol 49

Obtenção de mutantes e competitividade de isolados de bactérias resistentes a antibióticos
Itamar Soares de Melo e Rosa Maria Valdebenito Sanhueza 53

Obtenção de mutantes de *Trichoderma* spp. resistentes a fungicidas
Itamar Soares de Melo e Rosa Maria Valdebenito Sanhueza 55

Identificação de bactérias por análise dos ácidos graxos
Itamar Soares de Melo e Rosa Maria Valdebenito Sanhueza 59

Identificação de bactérias pelo seqüenciamento de genes 16S ribossômico (16S rDNA)
Fernando Dini Andreote 67

Identificação e diferenciação de linhagens de leveduras antagônicas a fitopatógenos utilizando sondas convencionais como indicadores na reação de polimerização em cadeia
Luis Fernando Revers e Rosa Maria Valdebenito Sanhueza 75

Produção de sideróforos por rizobactérias
Itamar Soares de Melo e Rosa Maria Valdebenito Sanhueza 79

Produção de antibióticos por microrganismos
Rosa T. S. Frighetto e Itamar Soares de Melo 83

Produção de bactérias para uso no controle biológico
Deise Maria Fontana Capalbo 97

Encapsulamento de microrganismos
Rosa Maria Valdebenito Sanhueza e Itamar Soares de Melo 103

Roteiro para formulação experimental pó molhável de biopesticida (sigla internacional WP)
Cláudia Medugno 109

Isolamento de actinomicetos visando ao controle biológico de fitopatógenos
Joelma Marcon, Jose Antonio da Silva e Maria Carolina Quecine ... 117

Avaliação *in vitro* da colonização de raízes por rizobactérias
Brígida P. Vilar Queiroz e Itamar Soares de Melo 121

Seleção de rizobactérias capazes de formarem biofilmes
Francisco Eduardo de C. Costa e Itamar Soares de Melo 125

Avaliação ecotoxicológica de microrganismos em organismos não-alvo, organismos aquáticos e mamíferos
Vera Lúcia de Castro e Cláudio Jonsson 129

Apêndice
Meios de Cultura e Soluções 137

Avaliação *in vitro* da colonização de raízes por rizobactérias

Brígida P. Vilar Queiroz[1]
Itamar Soares de Melo[2]

Vários métodos *in vitro* têm sido desenvolvidos para se observar a colonização de raízes por antagonistas como, por exemplo, o uso de tubos de ensaio com solo e placas com solo, ágar e papel de filtro. Entretanto, o emprego do Ágar Noble ou Phytagel permite o monitoramento visual das rizobactérias, principalmente no que se refere a sua habilidade de sobrevivência utilizando apenas os exsudatos radiculares. Desta forma, estas metodologias facilitam a seleção de um grande número de isolados rizobacterianos. A colonização radicular pode ser visualizada pela formação de uma turbidez de aspecto leitoso, que se forma ao longo das raízes, em conseqüência do crescimento bacteriano. Portanto, quanto mais transparente o meio, melhor a visualização da colonização (Figura 1). Assim sendo, os substratos (géis) citados acima apresentam uma turbidez natural, que em certos casos, interferem na sensibilidade do teste.

Objetivo

Visualizar *in vitro* a colonização de raízes por meio do crescimento bacteriano.

Protocolo

1. Sementes devem ser desinfestadas superficialmente em álcool 70% (2 min), hipoclorito de sódio 2% (10 min) e enxugadas com água destilada esterilizada. O inóculo de Pseudomonas putida (uma linhagem que sabidamente coloniza o sistema radicular) é produzido em caldo nutriente.

2. Inocular as sementes, por imersão, na suspensão bacteriana (10^{+} a 10^{8} ufc) por, aproximadamente, 30 min.

[1] Bióloga, Ph.D., Universidade Estadual Paulista - UNESP, Caixa Postal 199, 13506-900 Rio Claro, SP.
[2] Eng. Agrôn., Doutor, Embrapa Meio Ambiente, Caixa Postal 69, 13820-000 Jaguariúna, SP.

Foto: Itamar Soares de Melo

Fig. 1: A fotografia mostra o aspecto geral sobre o desenvolvimento radicular em um tubo contendo phytagel:água com o crescimento bacterino visível ao longo da raiz.

3. Transferir as sementes inoculadas para tubos de ensaios contendo o substrato phytagel (sigma): água (0,8% p/v). É aconselhável semear duas sementes (mesmo que o tamanho das sementes seja pequeno, como tomate, por exemplo) por tubo de 150 mm de comprimento por 25 mm de diâmetro. Os tubos devem ser fechados com tampão de algodão e incubados à temperatura de 28°C, com fotoperíodo de 12 horas. Para controlar a luminosidade nas raízes, os tubos devem ser cobertos externamente com papel, até a altura de gel.

4. A avaliação é feita periodicamente, considerando-se os seguintes parâmetros: germinação de sementes, presença de pêlos radiculares, comprimentos das raízes e presença de crescimento bacteriano ao redor das raízes. As raízes podem ser melhor avaliadas, utilizando-se um microscópio estereoscópico (Figura 2) e, uma vez detectado crescimento bacteriano, é possível então, proceder uma análise acurada via microscopia eletrônica, cujos procedimentos são descritos no item seguinte.

5. Segmentos de raízes devem ser fixadas em glutaraldeído 2% em tampão fosfato de sódio 0,1 M, desidratados por uma série alcoólica (15, 30, 60, 70, 95 e 100%), secos ao ponto crítico e metalizados com fina camada de ouro.

Referências Bibliográficas

HABE, M. H.; UESUGI. Método *in vitro* para avaliar a capacidade colonizadora de bactérias em raízes de tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, n. 4, p. 657-660, 2000.

LUGTENBERG, B. J. J.; DEKKERS, L.; BLOEMBERG, G. V. Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. **Annual Review Phytopathology**, v. 39, p. 461-490, 2001.

MELLO, I. S. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas: descrição e potencial de uso na agricultura. In: MELLO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. cap. 3, p. 87-116.

RANDHAWA, P. S.; SCHAAD, N. W. A seedling bioassay chamber for determining bacterial colonization and antagonism on plant roots. **Phytopathology**, v. 75, p. 254-259, 1985.

ROMEIRO, R. S.; TAKATSU, A.; UESUGI, C. H.; MOURA, A. B.; SILVA, H. S. A. Um método simples para seleção de rizobactérias com capacidade de promover colonização de raízes e sua implicação na indução de resistência sistêmica a enfermidades e na promoção do crescimento de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 24 , p. 255, 1999 Suplemento. Resumo 57.

SCHER, F. M.; ZIEGLE, J. S.; KLOEPPER, J. A method for assessing the root-colonizing capacity of bacteria on maize. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 30, p. 151-157, 1984.

Foto: Itamar Soares de Melo

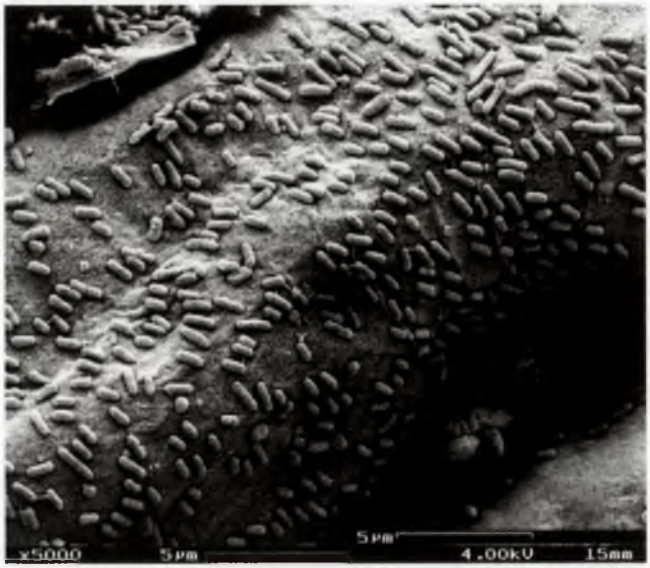


Fig. 2: A micrografia eletrônica mostra uma densa colonização de uma rizobactéria crescendo em raízes de algodão. A bactéria tinha sido inoculada nas sementes e estas semeadas em phytagel.