

# 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](mailto: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



# Seleção de rizobactérias capazes de formarem biofilmes

---

*Francisco Eduardo de C. Costa<sup>1</sup>  
Itamar Soares de Melo<sup>2</sup>*

As rizobactérias promotoras de crescimento em plantas atuam de modos distintos, desde a biosíntese e liberação de fitormônios ou enzimas líticas, até a proteção da planta por metabólitos biologicamente ativos. De igual importância para um bom estabelecimento da bactéria e, conseqüentemente, um efeito protetor é essencial que o microrganismo de interesse seja capaz de colonizar efetivamente a superfície dos tecidos vegetais (raiz, caule, folhas ou frutos). Diversos gêneros microbianos possuem essa habilidade de se aderir às superfícies bióticas ou abióticas, levando à formação de uma estrutura organizada conhecida como biofilme.

A formação desses biofilmes inicia-se com a motilidade das células microbianas seguida pela aderência das mesmas à superfície, formando uma monocamada. Com a reprodução das células aderidas tem-se a montagem de uma matriz extracelular (açúcares, proteínas e lipídios), levando ao surgimento de uma microcolônia, e por fim, o biofilme estável.

A eficiência em colonizar uma determinada superfície está diretamente ligada à fonte de açúcar presente, primordial para a síntese dos exopolissacarídeos (EPS). Esses açúcares são os principais componentes de inúmeros biofilmes. Outro fator que influencia a eficiência de colonização é a habilidade das células desprenderem-se da matriz polimérica para atingirem novos pontos de aderência. Isso se deve à capacidade de produção e liberação de surfactantes e/ou enzimas líticas (proteases, lipases e glucanases).

## Objetivo

Selecionar rizobactérias capazes de formarem biofilmes sobre superfícies abióticas para uma melhor colonização das superfícies vegetais.

---

<sup>1</sup> Biólogo, Mestre, Universidade do Vale do Sapucaí (UNIVÁS), Departamento de Biologia, Av. Prefeito Tuany Toledo, 37550-000 Pouso Alegre, MG.

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



## Protocolo

1. Preparar meio mínimo<sup>1</sup> líquido contendo o açúcar de interesse (glicose, frutose, manose ou lactose).
2. Inocular o isolado bacteriano, previamente crescido no meio de isolamento, em 10 mL do meio mínimo.
3. Incubar a cultura a 28°C<sup>2</sup> "overnight".
4. Transferir 0,1 mL da cultura crescida "overnight" para 10 mL do mesmo meio e agitar vigorosamente.
5. Lavar as microplacas<sup>3</sup> de pvc esterilizado com etanol 70%.
6. Deixar as microplacas secarem ao ar e à temperatura ambiente.
7. Transferir 100 µL da suspensão celular para as microplacas em duplicata. Lembrar de deixar dois controles negativos (apenas o meio de cultura esterilizado).
8. Recobrir as microplacas com filme plástico esterilizado e incubar a 28°C por 20 e 40 h.
9. Decorrido o tempo de incubação, remover o meio de cultura das microplacas e lavar cuidadosamente as microplacas com o auxílio de uma pisseta contendo água destilada, num total de cinco lavagens consecutivas. Esta etapa visa à remoção das células frouxamente aderidas.
10. Deixar secar as microplacas por 45 min à temperatura ambiente.
11. Adicionar a cada poço 150 µL de cristal violeta 1% em água.
12. Deixar corar por 45 min.

---

<sup>1</sup> Caso o isolado bacteriano não cresça no meio mínimo pode ser utilizado o mesmo meio no qual se realizou o isolamento.

<sup>2</sup> Ou a temperatura ideal de crescimento do organismo testado.

<sup>3</sup> Podem ser utilizados tubos do tipo eppendorf de polipropileno, deixados por três dias em solução concentrada de Extram, lavados em água destilada (três lavagens de 20 min cada no microondas) secos e autoclavados.

13. Lavar cuidadosamente as microplacas como descrito anteriormente e deixar secar por 45 min. Neste momento, pode-se observar a coloração arroxeada das paredes, indicando a formação de biofilme.
14. Adicionar 200  $\mu\text{L}$  de etanol 95% a cada poço. O álcool irá eluir o cristal violeta presente nas células aderidas às paredes das microplacas que formam o biofilme.
15. Aguardar 1 min antes de realizar a leitura<sup>1</sup> (densidade óptica) no espectrofotômetro a 595 nm.
16. Subtrair os valores do controle negativo dos valores observados no teste.
17. Repetir o procedimento três vezes para, então, calcular as médias e desvios-padrões.

<sup>1</sup> Caso o isolado bacteriano não cresça no meio mínimo pode ser utilizado o mesmo meio no qual se realizou o isolamento.

<sup>2</sup> Ou a temperatura ideal de crescimento do organismo testado.

<sup>3</sup> Podem ser utilizados tubos do tipo eppendorf de polipropileno, deixados por três dias em solução concentrada de Extram, lavados em água destilada (três lavagens de 20 min cada no microondas) secos e autoclavados.

<sup>4</sup> Utilizar cubetas extremamente limpas e entre as leituras lavar as cubetas com etanol ou acetona e secar cuidadosamente para não alterar os resultados.

Obs: Se não possuir cubeta para 100  $\mu\text{L}$ , multiplicar os volumes citados neste protocolo por um fator (cinco ou dez vezes) para poder realizar a leitura, esta alteração é válida para as etapas posteriores ao preparo da suspensão bacteriana.

## Literatura Consultada

AMELLAL, N.; BURTIN, G.; BARTOLI, F.; HEULIN, T. Colonization of wheat roots by an exopolysaccharide-producing *Pantoea agglomerans* strain and its effect on rhizosphere soil agregation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 10, p. 3740-3747, 1998.

---

<sup>1</sup> Utilizar cubetas extremamente limpas e entre as leituras lavar as cubetas com etanol ou acetona e secar cuidadosamente para não alterar os resultados.

BAIS, H. P.; FALL, R.; VIVANCO, J. M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of Arabidopsis roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. **Plant Physiology**, v. 134, p. 307-319, 2004.

DAVEY, M. E.; O'TOOLE, G. A. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 4, p. 847-867, 2000.

DJORDJEVIC, D.; WIEDEMANN, M.; McLANDSBOROUGH, L. A. Microtiter Plate Assay for Assessment of *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 6, p. 2950-2958, 2002.

MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F.; SAMBROOK, J. **Molecular cloning**: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor, 1989. p. 112.

WALKER, T. S.; BAIS, H. P.; DÉZIEL, E.; SCHWEIZER, H. P.; RAHME, L. G.; FALL, R.; VIVANCO, J. M. *Pseudomonas aeruginosa*: plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation, and root exudation. **Plant Physiology**, v. 134, p. 320-331, 2004.