

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

Avaliação ecotoxicológica de microrganismos em organismos não-alvo, organismos aquáticos e mamíferos

Vera Lúcia de Castro¹

Cláudio Jonsson²

A avaliação de impacto decorrente do uso dos biopesticidas requer conhecimento do produto e seus metabólitos, sua interação com os alvos específicos e com o ambiente aonde ele será aplicado. Os possíveis efeitos adversos diretos e indiretos produzidos pela introdução de microrganismos no ambiente, podem ocorrer sobre organismos não-alvo da comunidade local, incluindo representantes de importância econômica, ecológica e ou social. Tais efeitos envolvem a possibilidade de sobrevivência, multiplicação, persistência, disseminação, patogenicidade e toxicidade. Assim, a análise desses agentes envolve estudos em laboratório anteriores à sua liberação (CASTRO et al., 2001).

A avaliação de possíveis riscos a organismos não-alvo é geralmente realizada em um sistema de fases subseqüentes (CASTRO; JONSSON, 2000):

Na Fase I da avaliação ecotoxicológica, o conceito de risco máximo baseia-se na pior situação de exposição, em termos de dose – a dose desafio, considerada de risco máximo (100 a 1.000 vezes a dose utilizada a campo). Supõe-se que a alta concentração de unidades do agente microbiano utilizada nesta Fase seja suficiente em ocasionar efeito adverso em organismo não-alvo caso o agente possua potencial de causar infecção ou se ocorrer a presença de toxina (JONSSON; MAIA, 1999).

Já os testes usados para a avaliação destes agentes em relação à saúde humana, para avaliar a toxicidade, patogenicidade e infectividade do produto; são baseados na extrapolação de resultados interespecies entre a espécie escolhida, geralmente um roedor, e o homem. Para tanto, testa-se em animais de laboratório a administração de uma dose desafio ao redor de 1×10^8 unidades infectantes do produto (CASTRO et al., 1999).

¹ Médica Veterinária, Doutora, Embrapa Meio Ambiente, Laboratório de Ecotoxicológica e Biossegurança, Caixa Postal 69, 13820-000 Jaguariúna, SP. E-mail: castro@cnpma.embrapa.br

² Farmacêutico, Doutor, Embrapa Meio Ambiente, Caixa Postal 69, 13820-000 Jaguariúna, SP. E-mail: jonsson@cnpma.embrapa.br

Caso sejam observadas quaisquer evidências de patogenicidade e/ou toxicidade, procede-se aos testes da fase seguinte até um máximo de três fases para testes referentes à saúde humana em roedores e quatro fases para organismos aquáticos.

Protocolo

1. Organismos aquáticos

A metodologia proposta para a avaliação de risco de biopesticidas no sistema aquático segue o esquema de Fases (PESTICIDE 1989; JONSSON; MAIA, 1999). Neste sistema, os organismos-teste são submetidos inicialmente a uma dose máxima do agente microbiano de controle (Fase I).

Os impactos ambientais causados são estimados através de testes que utilizam a *dose desafio*.

Se os testes iniciais não indicarem danos significativos, então nenhum outro teste é geralmente necessário. Entretanto, se forem encontrados resultados significativos na Fase I, então são exigidos os testes da Fase II, e assim sucessivamente.

O agente é testado quanto a seu potencial em manifestar efeitos adversos em organismos pertencentes a três níveis tróficos da cadeia alimentar (algas, microcrustáceos e peixes). Para tanto, são realizados estudos com o objetivo de se avaliar o risco de patogenicidade/toxicidade do microrganismo para um produtor primário (*Selenastrum capricornutum*), um consumidor primário (*Daphnia similis*) e um vertebrado aquático (*Hyphessobrycon scholzei*).

1.1. Avaliação de risco de dose máxima da exposição em organismos zooplanctônicos

No experimento com o invertebrado aquático *Daphnia similis*, a água de diluição é preparada conforme os procedimentos de Hosokawa et al. (1991) e Elendt e Bias (1990).

O número inicial de organismos em cada unidade experimental é de 12 neonatos/500 mL.

Os tratamentos, que consistem em réplicas de cinco unidades experimentais (beckers), são os seguintes: sem microrganismo (controle), com microrganismo inativado (10^6 esporos/mL autoclavados), e com microrganismo ativo (10^6 esporos/mL).

A concentração de unidades infectantes por volume de suspensão deve ser equivalente à concentração obtida pela aplicação de uma vez ou até 100 vezes a dose agrônômica de unidades infectantes utilizada em campo, estimando-se uma lamina de água de 15 cm de profundidade. Em caso desta dose não estar ainda definida, a concentração mínima a ser utilizada deve ser de 10^6 unidades/mL (JONSSON; MAIA, 1999).

O período de exposição dos organismos é de 21 dias em sistema semi-estático, ou seja, com renovação do meio a cada 48, 96 e 168 horas em cada semana.

A temperatura de exposição e a luminosidade são de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e 900-1100 lux, respectivamente.

A amostragem para se avaliar o número de neonatos/fêmea/dia e a taxa de mortalidade é realizada antes de cada renovação do meio.

1.2. Avaliação de risco de dose máxima da exposição em organismos fitoplânctônicos

No experimento com a alga clorofícea *Selenastrum capricornutum*, o meio de cultura é preparado conforme procedimento da OECD (1981).

Os organismos são expostos a três tipos de tratamento sendo que o número inicial de células/mL em cada unidade experimental é de 105.

Os tratamentos, que consistem em réplicas de, no mínimo, quatro unidades experimentais (erlenmeyers) são: controle, ativo e inativo.

Os organismos são expostos durante 96 horas à temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e luminosidade de 3.000-4.000 lux.

A amostragem em cada recipiente é realizada a cada 24 horas com o objetivo de se avaliar a taxa de reprodução em função do tempo.

1.3. Avaliação de risco de dose máxima de exposição em vertebrados aquáticos

Os estudos com vertebrados aquáticos são realizados com organismos característicos do ecossistema em estudo. Podem, por exemplo, serem usados peixes da família *Characidae* (*Hyphessobrycon scholzei*).

Os peixes (grupos de 20 peixes) são expostos a três tratamentos conforme descrito anteriormente (controle, ativo e inativo) sendo que o meio é composto de água de poço artesiano ou reconstituída. Cada grupo é dividido em dois subgrupos de 10 organismos de modo que cada tratamento consiste em dois aquários.

Os ensaios são conduzidos em aquários de vidro e em volumes de 8 litros de água, contendo ou não, o agente biológico em estudo.

A mortalidade e alterações do padrão normal de comportamento são avaliadas durante 30 dias de exposição.

Após esse período, os organismos são homogenizados em solução NaCl 0,9%.

De um volume total de 10 mL do homogenizado são feitas diluições 10^{-1} e 10^{-2} .

O plaqueamento é realizado aplicando-se 0,1 mL destas diluições em placas de Petri contendo meio malte-agar.

É determinado o número de UFC (unidades formadoras de colônias)/mg de tecido.

2. Avaliação toxicopatológica em animais de laboratório decorrente da exposição a microorganismos – mamíferos

Os procedimentos para a avaliação toxicopatológica em animais de laboratório seguem o esquema de Fases (PESTICIDE 1989, CASTRO et al., 1999). O protocolo estabelece diretrizes para a condução de testes com mamíferos, com a finalidade de se avaliar o potencial de efeitos indesejáveis causados por agentes microbianos de controle. Esses testes são conduzidos em uma seqüência de três fases, considerando os seguintes aspectos: infectividade, toxicidade e patogenicidade do microorganismo, de contaminantes microbianos e sub-produtos de fabricação.

2.1. Animais

São utilizados ratos Wistar, machos e fêmeas, com aproximadamente 230 g de peso corporal, mantidos em condições padronizadas de luz (ciclo claro/escuro 12 h) e temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) em gaiolas de polipropileno.

2.2. Doses e tratamentos

A linhagem avaliada é administrada a ratos, em suspensões de 109 esporos/mL ou a máxima concentração possível. Um igual número de machos e fêmeas recebe os tratamentos, perfazendo três animais em cada período de observação.

As suspensões com o microrganismo são administradas por diversas vias de exposição. Os volumes administrados por animal teste dependem da via utilizada e não são superiores a 1,0 mL/100 g de peso para a via oral. Para a via oral utiliza-se uma cânula metálica adequada e a água e a ração são retiradas 24 h antes da administração da suspensão teste.

São utilizados três tratamentos para cada via: microrganismo ativo (AT), microrganismo inativado (IN) e o veículo de administração do microrganismo, como controle (CT).

Os animais são observados diariamente com relação ao aparecimento de alterações clínicas.

2.3. Observação dos animais

2.3.1. Sinais e sintomas

São observados diariamente, após a exposição, os seguintes itens: pele e pelo; olhos e mucosas; sistemas respiratório e circulatório; sistema nervoso periférico e central (tremor, diarreias, convulsão, letargia e salivação); padrão comportamental e tempo de morte.

2.3.2. Patologias e presença do microrganismo

Todos os animais são sacrificados ao final dos testes em uma cuba de vidro com algodão embebido em éter etílico ou com gás carbônico e submetidos à necropsia com observação macroscópica dos órgãos.

Os animais são sacrificados no dia da administração (dia 0) após 1, 3 e 6 horas após a exposição, com a retirada dos rins, fígado, pulmão e mesentério para verificar a presença do fungo nestes tecidos em uma câmara de fluxo laminar. Eles são pesados e homogeneizados com solução salina (NaCl 0,9%). A cada nova amostra, a haste do homogeneizador de tecidos e o material cirúrgico utilizados são limpos com solução salina, seguida de solução de hipoclorito a 2% e solução salina, esterilizada, em frascos distintos.

O material sob análise, devidamente homogeneizado, é submetido à diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) em solução salina esterilizada e plaqueado em meio de cultura apropriado, em triplicatas para cada diluição.

As amostras plaqueadas são incubadas por tempo e temperaturas adequadas para o crescimento do microrganismo.

O número de colônias obtidas por placa é anotado e o resultado expresso como média de repetições, transformando segundo cálculo de diluições, pesos e volumes, apresentado como unidades formadoras de colônias (UFC/mL da suspensão).

Referências Bibliográficas

CASTRO, V.; CAPALBO, D.; MORAES, G.; NARDO, E.; OLIVEIRA, M. **Protocolos de avaliação de agentes microbianos de pragas para registro como biopesticidas**: testes toxicopatológicos em mamíferos. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1999. v. 2. (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 10).

CASTRO, V.; JONSSON, C. Avaliação de risco ecotoxicológico de biopesticidas: mamíferos e organismos aquáticos. In: MELO, I.; AZEVEDO, J. **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. v. 3, p. 251-308.

CASTRO, V.; JONSSON, C.; MELO, I.; NUNES, F. Avaliação de risco ecotoxicológico de *Trichoderma stromaticum* usado como biopesticida. **Ecotoxicology and Environmental Restoration**, v. 4, n. 1, p. 18-24, 2001.

ELENDT, B. P.; BIAS, W. R. Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing. Effects of the optimization of culture conditions on life history parameters of *D. magna*. **Water Research**, Elmsford, v. 24, p. 1152-1167, 1990.

HOSOKAWA, M.; ENDO, G.; KURODA, K.; HORIGUCHI, S. Influence of sulfate, Ca and Mg on the acute toxicity of potassium dichromate to *Daphnia similis*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, Lake Alfred, v. 46, p. 461-465, 1991.

JONSSON, C. M.; MAIA, A. H. N. **Protocolo de avaliação de agentes microbianos de controle biológico de pragas para registro como biopesticidas**: testes em organismos não alvo do ambiente aquático. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1999. 33 p. (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 3).

OECD. **Guideline for testing chemicals**. Paris, 1981.

PESTICIDE 1989: assessment guidelines. Washington: U.S. Environmental Protection Agency, Office of Pesticides and Toxic Substances, 1989. 192 p.