



**REDUÇÃO DA VIABILIDADE DE ESPORÂNGIOS DE *Plasmopara viticola* POR
BACTÉRIAS NATIVAS DO FILOPLANO DA Videira**

Lenise **Rossetto**¹; Bernardo de Almeida **Halfeld Vieira**²; Rosemeire de Lellis **Naves**³

Nº 14406

RESUMO – O míldio é uma das principais doenças da videira, capaz de causar danos significativos à cultura e aumentar os custos de produção. Seu controle demanda o uso intensivo de agrotóxicos, cujos resíduos são indesejáveis. Este trabalho teve como objetivo investigar o potencial uso de bactérias do filoplano em reduzir a viabilidade de esporângios de *Plasmopara viticola*. Foram testados trinta e cinco isolados bacterianos obtidos do filoplano de videira. Os testes de antagonismo foram feitos em lâminas de microscopia e em discos de folha, adicionando-se 50 µL de uma suspensão bacteriana e 50 µL de uma suspensão de esporângios. Nos testes em lâmina de microscopia, vinte e nove isolados inibiram a germinação dos esporângios de *Plasmopara viticola*. Destes, os isolados 1, 37 e 12 se destacaram, por serem capazes de inibir também a liberação de zoósporos. Em discos de folha, o isolado 1 foi o único capaz de inibir a liberação dos zoósporos, significativamente em relação à testemunha. Nesta condição, não houve a germinação dos esporângios, apenas a liberação de zoósporos.

Palavras-chaves: Míldio, videira, controle biológico

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Ciências Biológicas, Uniararas; lenise.rossetto@hotmail.com

2 Orientador: Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; bernardo.halfeld@embrapa.br

3 Colaboradora, Pesquisadora da Embrapa Uva e Vinho, Jales-SP



ABSTRACT- *The downy mildew is one of the main grapevine diseases, able to cause significant damage to the crop and increase production costs. It's control demand intensive use of pesticides, which residues are undesirable. This study aimed to investigate the potential of phylloplane bacteria in reducing the viability of sporangia of *Plasmopara viticola*. Thirty-five bacterial isolates from phylloplane of grapevine were tested. The antagonism tests were conducted on microscopy glass blades and on leaf discs, adding 50 μ L of a bacterial suspension and 50 μ L of a suspension of sporangia. Twenty-nine isolates inhibited the germination of the sporangia of *Plasmopara viticola* in tests conducted on glass blades. Of these, isolates 1, 37 and 12 were able to inhibit the release of zoospores. In the leaf discs test, the isolate 1 was the single able to inhibit the release of zoospores, significant compared to the control. In this condition, there wasn't germination of sporangia, only zoospores release.*

Key-words: Downy mildew, grapevine, biological control

1 INTRODUÇÃO

Os danos causados por fungos e cromistas à cultura da videira reduzem a produtividade, alteram a qualidade dos frutos e elevam os custos de produção. Dentre as doenças da parte aérea da planta, o míldio é uma das que causam maior impacto à cultura (AMORIM; KUNIYUKI, 2005).

O seu agente causal é *Plasmopara viticola*, extremamente danoso à produção da uva onde o verão é úmido (AMORIM; KUNIYUKI, 2005).

Os sintomas da doença ocorrem predominantemente nas folhas com o surgimento de manchas pálidas. Com a alta umidade, na parte abaxial da folha, na mancha, formam-se eflorescências densas que são as frutificações, progredindo para necrose foliar (AMORIM; KUNIYUKI, 2005).

O principal meio de controle adotado pelos produtores é o uso de agrotóxicos, porém seu uso excessivo tem selecionado estirpes de fitopatógenos mais resistentes e, principalmente, danos ao meio ambiente (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN, 2005). Desse modo, cada vez mais o mercado exige práticas de controle fitossanitário com menor uso de agrotóxicos e redução de impactos ao meio ambiente (FORNAZIER; WAQUIL, 2011).



Assim, tem-se buscado um manejo de doenças dentro de um contexto agroecológico, o que inclui o controle biológico (STANGARLIN et al., 2008) em que bactérias de filoplano podem configurar uma alternativa de controle, já que ocupam o mesmo nicho que o patógeno.

Portanto, este trabalho teve por objetivo selecionar bactérias nativas de filoplano de videira capazes de reduzir a viabilidade de esporângios de *Plasmopara viticola*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Isolamento de bactérias do filoplano

Foram adicionados 1,5 g de folhas de videira em 100 ml de solução salina, deixando-se em agitação a 190 rpm por 15 minutos. Desta suspensão, foram pipetados 500 µL em um tubo com 4,5 ml de solução salina, seguido por diluições seriadas em fator 1:10. De cada diluição foram pipetados 100 µL em placas de Petri contendo meio 523 (KADO; HESKETT, 1970) e espalhados com alça de Drigalski. As placas foram colocadas em incubação a 25°C e, após 48 horas, colônias individualizadas e distintas visualmente de bactérias foram repicadas para tubos com mesmo meio.

2.2 Testes de antagonismo em lâmina de microscopia

As bactérias isoladas foram previamente repicadas em meio 523 (KADO; HESKETT, 1970), ajustadas em espectrofotômetro a $A_{540} = 0,40$ e aplicados 50 µL diretamente em lâmina. Posteriormente, foram adicionados 50 µL de solução de esporângios coletados de folhas de videira com sinais do patógeno. Foram utilizadas três repetições por isolado e para a testemunha, ao invés da suspensão bacteriana, foi usada água destilada esterilizada. As lâminas ficaram sobre papel úmido, em caixas gerbox fechada em incubação a 20°C por 48 horas no escuro. Posteriormente foi analisado por meio de microscopia, o percentual de esporângios que liberaram zoósporos e o percentual de germinação dos esporângios que não foram capazes de liberar zoósporos. As análises estatísticas dos dados foram realizadas por meio do teste de Tukey e Dunnett ($p < 0,05$) utilizando-se o programa SAS versão 9.1. A partir dos resultados obtidos, foi realizado o mesmo experimento somente com os isolados que demonstraram melhor capacidade inibitória, aumentando-se o número de repetições para doze.



2.3 Testes de antagonismo em disco de folha

Foram coletados discos de folha de 2 cm de diâmetro, de planta de videira sadia da cv. Itália. Os discos foram colocados em flutuação em água destilada contida em placas de Petri, com doze repetições para cada isolado bacteriano melhor avaliado no teste em lâmina. Nos discos, foram depositados ao centro, 50 µL de uma suspensão bacteriana ajustada em espectrofotômetro $A_{540} = 0,20$. Para a testemunha foi utilizada somente água destilada esterilizada. As placas foram levadas a incubadora a 20°C em escuro contínuo. Após 24 horas foram adicionados sobre o local em que se colocou a suspensão bacteriana, 50 µL de suspensão de esporângios coletados da planta com a doença, mantendo-se por 24 horas em incubação nas mesmas condições. Após esse período, os discos ficaram por 1 hora em solução descolorante composta por ácido acético, álcool 92,8% e água destilada, na proporção 2:2:1 (BAYLISS, 2000). Em seguida, os discos de folha foram corados com azul de tripan e colocados em lâminas com lamínulas, observando-se em microscopia, o percentual de esporângios que liberaram zoósporos e o percentual de germinação dos esporângios que não foram capazes de liberar zoósporos (adaptado de Williams et al., 2007). As análises estatísticas dos dados foram realizadas por meio do teste de Tukey e Dunnett ($p < 0,05$) utilizando-se o programa SAS versão 9.1.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o teste em lâminas de microscopia, dos 35 isolados analisados, 29 inibiram a germinação dos esporângios de *Plasmopara viticola* significativamente em relação à testemunha. A figura 1 representa todos os isolados, sendo que os antagonistas 1, 12 e 37 foram capazes de inibir também a liberação de zoósporos. Os esporângios em presença de condições ideais para ocorrência de epidemias liberam em média 8 zoósporos biflagelados, onde estes originam cistos, que germinam e constituem unidades infectivas causando novas lesões na folha (RUMBOLZ et al., 2002; AMORIM; KUNIYUKI, 2005) e que irão causar novas infecções em outro local da folha. Em condições não ideais, os esporângios germinam diretamente, sem liberarem zoósporos. Portanto, antagonistas capazes de inibirem tanto a germinação de esporângios, quanto a liberação de zoósporos, apresentam maior potencial em controlar a doença, pois podem diminuir consideravelmente o número de propágulos infectivos do patógeno.



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014
12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

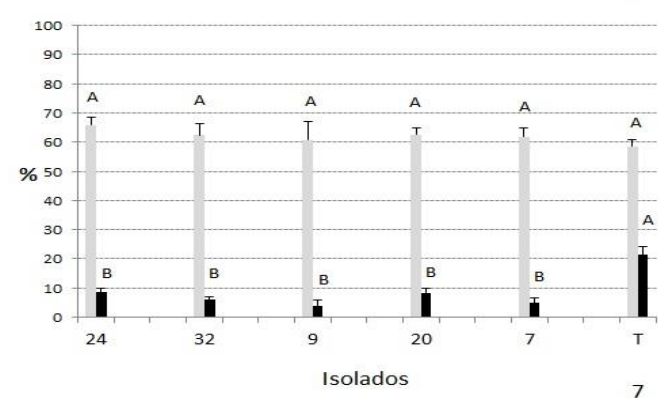
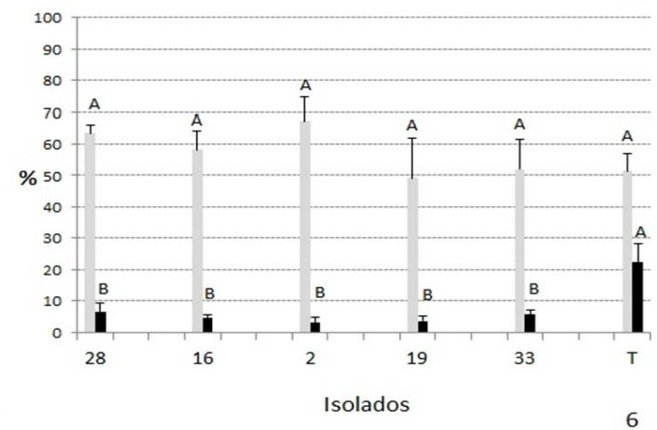
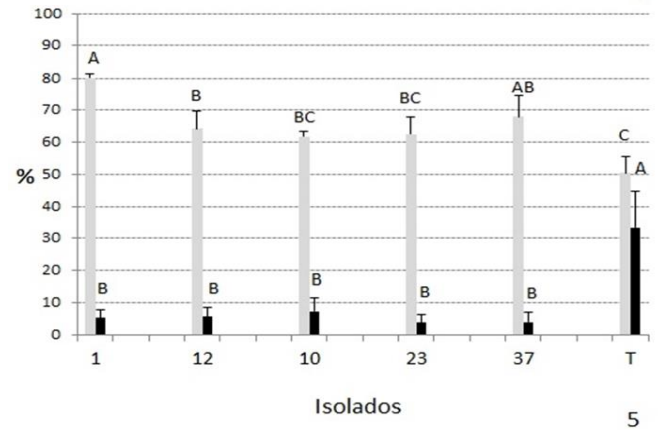
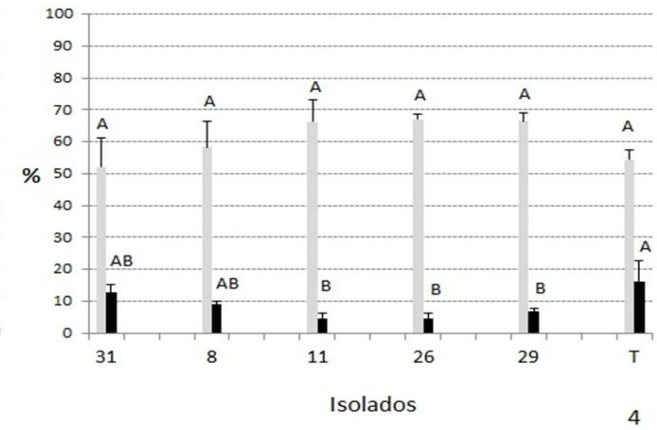
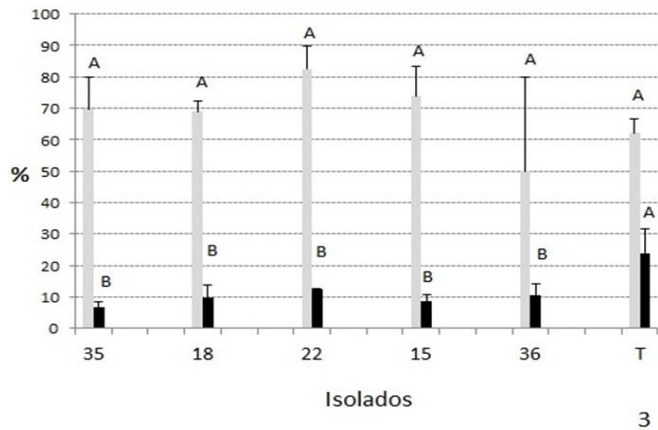
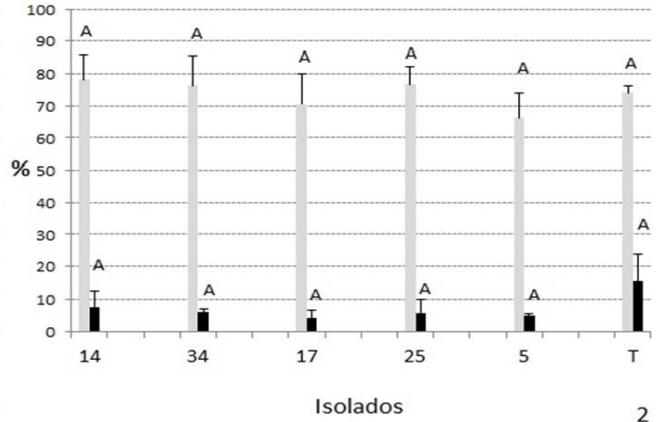
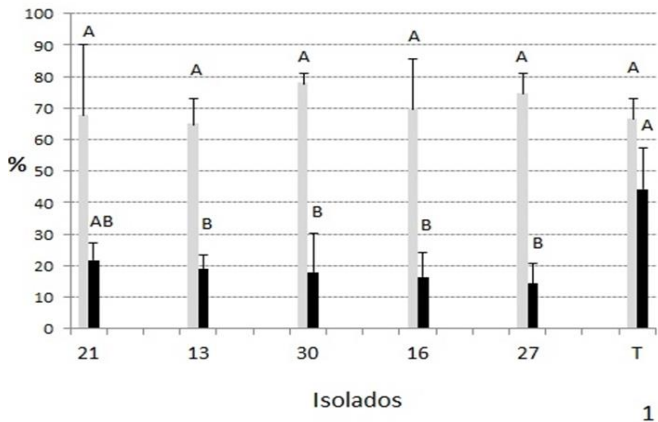




Figura 1. Barras em cinza representam o percentual de esporângios cheios e barras em preto representam o de esporângios cheios germinados para os 35 isolados testados. Cada gráfico representa uma etapa de testes, comparando cinco isolados distintos de bactérias do filo plano. Os valores correspondem às médias e as barras representam o desvio padrão. Médias indicadas pela mesma letra não apresentam diferença significativa de acordo com o teste de Tukey a 5%.

Dentre os isolados testados, o de código 1 foi o que apresentou maior capacidade de inibição da liberação de zoósporos, seguido pelos isolados 37 e 12.

No teste de confirmação para estes três isolados selecionados, verificou-se que o isolado de código 1 novamente promoveu maior percentual de inibição para a germinação de esporângios cheios e para liberação de zoósporos, seguido pelo isolado 37 e pelo 12. A figura 2 representa esses dois atributos, onde os três isolados diferiram estatisticamente da testemunha, de acordo com o teste Dunnett a 5%.

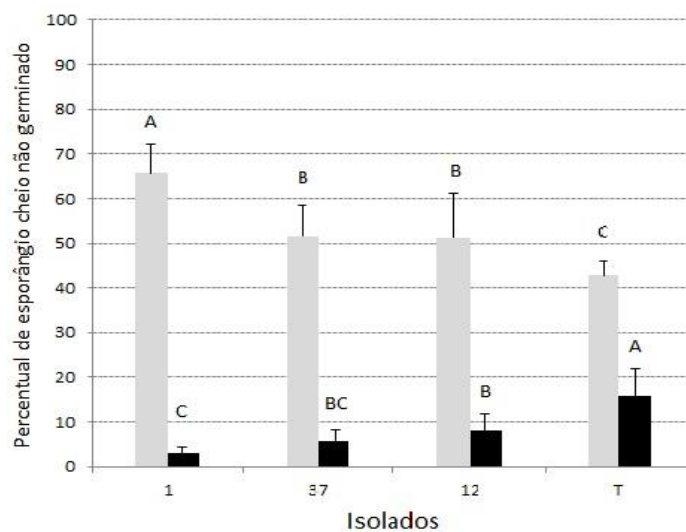


Figura 2. Barras em cinza representam o percentual de esporângios cheios e barras em preto representam o percentual de esporângios cheios germinados para os isolados selecionados. Os valores representam as médias e a barra o desvio padrão. Médias indicadas pela mesma letra não apresentam diferença significativa de acordo com o teste de Tukey a 5%. Todos os tratamentos diferiram da testemunha, conforme o teste Dunnett a 5%.

Para os testes com os discos de folha, não foram observados esporângios cheios germinados. Nesta condição, somente foram verificados esporângios capazes ou não de liberar zoósporos. A figura 3 representa neste ensaio, que somente o antagonista 1 demonstrou



capacidade de inibição para liberação de zoósporos. Os isolados 37 e 12 não diferiram estatisticamente da testemunha pelo teste de Tukey e Dunnett a 5%. Portanto, os testes realizados em lâminas de microscopia e discos de folha revelaram que o isolado 1 apresentou maior consistência de resultados na capacidade de inibição tanto para a germinação dos esporângios quanto para a liberação dos zoósporos. Portanto, preconiza-se que o teste em disco de folha, mais próximo às ideais para o desenvolvimento do patógeno, favoreceu que os esporângios liberassem zoósporos, em detrimento da germinação de esporângios, o que aumentaria a densidade de inoculo capaz de causar infecção.

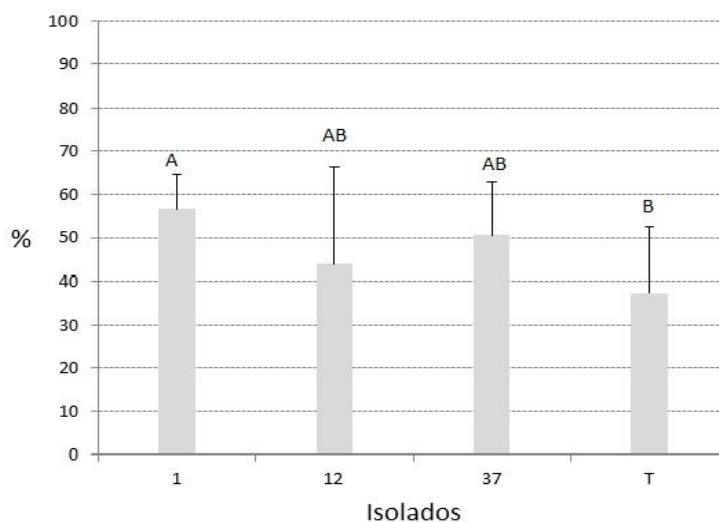


Figura 3. Barras em cinza representam o percentual de esporângios cheios para os isolados selecionados em teste em disco de folha. Os valores representam as médias e a barra o desvio padrão. Médias indicadas pela mesma letra não apresentam diferença significativa de acordo com o teste de Tukey a 5%. Somente o isolado 1 diferiu da testemunha, conforme o teste Dunnett a 5%.

4 CONCLUSÃO

O isolado de código 1 foi capaz de inibir a germinação de esporângios cheios, assim como a liberação de zoósporos, apresentando potencial de controle do agente causal da doença.

5 AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, pela bolsa concedida ao primeiro autor.



6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIM, L.; KUNIYUKI, H. Doenças da videira. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, 4. ed., p.639-651, 2005.
- BAYLISS, K.L.; **Host-pathogen interactions between two cultivars of subterranean clover and *Kabtiella caulivora* Race 1 and Race 2**. 2000. PhD thesis. Faculty of Natural and Agricultural Sciences, The University of Western Australia, Perth, Western Australia.
- FORNAZIER, A; WAQUIL, P. D. A produção integrada de frutas como um mecanismo de menor impacto ao meio ambiente. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**. Brasília, v. 28, n. 1, p. 341-365, 2011.
- KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, p.969-976, 1970.
- RUMBOLZ, J.; WIRTZ, S.; KASSEMEYER, H.H.; GUGGENHEIM, R.; SCHAFFER, E.; BUCHE, C. Sporulation of *Plasmopara viticola*: Differentiation and light regulation. **Plant Biology**, v.4, p.413-422, 2002.
- SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R. Extratos e óleos essenciais de plantas medicinais na indução de resistência. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005, p.125-133.
- STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Controle de doenças de plantas por extratos de origem vegetal. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.16, p.265-304, 2008.
- WILLIAMS, M. G.; MAGAREY, P. A.; SIVASITHAMPARAM, K. Effect of temperature and light intensity on early infection behavior of a Western Australian isolate of *Plasmopara viticola*, the downy mildew pathogen of grapevine. **Australasian Plant Pathology**, v. 36, p. 325-331, 2007.