

# *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

# Obtenção de epífitas de frutos e seleção de antagonistas no controle de podridões de pós-colheita

---

*Rosa Maria Valdebenito Sanhueza*<sup>1</sup>  
*Itamar Soares de Melo*<sup>2</sup>

Os exsudatos produzidos pelos frutos propiciam o desenvolvimento de grupos de organismos que têm maior competência pelo aproveitamento desses nutrientes. Dependendo do estágio de desenvolvimento do fruto, das condições do manejo e do impacto ambiental na cultura, esses exsudatos podem variar em composição, interferindo quantitativa e qualitativamente na população epífita.

A capacidade desses microrganismos epífitas utilizarem rapidamente os nutrientes disponíveis na superfície e/ou nos ferimentos dos frutos, bem como, a produção de substâncias antibióticas, serão fatores que podem interferir no processo de infecção dos patógenos nos frutos. Assim, a seleção dos melhores competidores, com adaptação igual ao do patógeno no fruto, contribuirá para o controle das podridões. Visto que a produção de antibióticos pelos antagonistas nos frutos não é desejável, a seleção visará somente obter microrganismos que tenham grande capacidade de competição pelos nutrientes disponíveis na superfície e polpa dos frutos e a seleção mais eficiente dos organismos neste caso será feita a partir dos colonizadores dos mesmos.

## Objetivos

Obtenção e seleção de colonizadores da superfície de frutos para proteção de infecção causada por patógenos.

---

<sup>1</sup> Eng. Agrôn., Doutor, Embrapa Uva e Vinho, Caixa Postal 130, 95700-000 Bento Gonçalves, RS.

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



Foto: Rosa Maria Vaidabentio Sanhuzera



**Fig. 1.** Epífitas em maçãs.

## Protocolo

1. Colher frutos sadios nos estágios de maturação desejada e imergi-los em água destilada contendo 0,005% de Tween 80. Podem ser utilizados três frutos de 5 a 6 cm de diâmetro e 500 mL de água submetendo-os à agitação durante 30 minutos ou colocá-los em 100 mL de água e agitar por 30 segundos em banho ultra-som.
2. Amostras de 0,5 mL da suspensão obtida de duas diluições seriadas serão distribuídas em três placas de Petri contendo meios de cultura tais como: meio King B com 0,01% de benomil; ágar-extrato de malte; ágar nutritivo mais extrato de levedura mais dextrose e BDA.

3. Após o surgimento das colônias, cada tipo morfológicamente diferente será purificado e codificado. Para avaliar o controle dos organismos obtidos podem ser utilizados frutos desinfestados superficialmente ou não, com e sem ferimentos. Após lavagem em água corrente durante uma hora, proceder-se-á à desinfestação dos frutos que deve ser feita umedecendo-os com algodão embebido em álcool 80% e deixando-os ao ambiente para secar. Para efetuar ferimentos, podem ser utilizadas agulhas de 2 mm de diâmetro previamente esterilizadas.
4. Para avaliação do efeito preventivo dos epífitas, a fruta será suspensa por 3 min na suspensão de células de cada isolado e 12 a 24 h após, inoculada com o patógeno, incubada e avaliado o número de frutos com lesões e, se necessário, o tamanho das lesões. A concentração das suspensões deve ser padronizada. Recomenda-se que na seleção inicial, para bactérias e leveduras, a suspensão seja de 71% de transmitância a 570 nm e, para fungos filamentosos, de  $10^7$  a  $10^8$  cel/mL. É importante lembrar que se utilizado meio de cultura líquido, as células deverão ser submetidas à centrifugação e ressuspensão em água, para diminuir os nutrientes residuais. A inoculação dos frutos será feita com uma suspensão de esporos do patógeno que tenha a concentração suficiente para induzir 50 a 70% de doença.

Para a triagem inicial podem ser utilizados três a quatro frutos, cada um com três a quatro ferimentos. Nos próximos testes para confirmação da seleção pode ser aumentado o número de frutos por isolado (três ou mais repetições com parcelas com 10 a 100 frutos).

5. Para determinação do efeito curativo, o método de preparo e seleção de frutos e da inoculação e concentração do inóculo do patógeno será semelhante ao descrito anteriormente para o controle preventivo. Neste caso, inicialmente será feita a inoculação com o patógeno e, após um período de incubação, os frutos deverão ser imersos ou aspergidos com os epífitas avaliados. O intervalo necessário entre os procedimentos será o necessário para assegurar a germinação dos esporos e início da infecção no fruto. Assim, recomenda-se testar períodos de 8, 16 e 24 horas de incubação, quando o trabalho é desenvolvido à temperatura de 18 a 22°C e após 24 a 36 horas quando trabalha-se com refrigeração (0-1°C). As variáveis que determinarão a seleção de isolados antagonísticos serão o controle da doença, a diminuição do número de lesões em comparação com a testemunha, o tamanho das podridões e a supressão da esporulação.

## Literatura Consultada

HUANG, Y.; DEVERALL, B. J.; MORRIS, S. C.; WILD, B. L. Biocontrol of postharvest orange diseases by a strain of *Pseudomonas cepacia* under semi-commercial conditions. **Postharvest Biology and Technology**, v. 3, p. 293-304, 1993.

JANISIEWICZ, W. J. Biocontrol of post-harvest diseases of apple with antagonist mixtures. **Phytopathology**, v. 78, p. 194-198, 1988.

JANISIEWICZ, W. J. Post-harvest biology of blue mold on apples. **Phytopathology**, v. 77, n. 2, p. 481-485, 1987.

JANISIEWICZ, W. J.; ROITMAN, J. Biological control of blue mold on apple and pear with *Pseudomonas cepacia*. **Phytopathology**, v. 78, n. 12, p. 1697-1700, 1988.

McLAUGHLIN, R. J.; WISNIEWSKI, M. E.; WILSON, C. L.; CHAULUTZ, E. Effect of inoculum concentration and salt solutions on biological control of post-harvest diseases of apple with *Candida* sp. **Phytopathology**, v. 80, n. 5, p. 456-461, 1990.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M. Controle de *Penicillium expansum* resistente a benzimidazóis em maçãs de frigoríficos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 8, n. 2, p. 31-34, 1986.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; KRETZSCHMAR, A. A.; BORSOI, M. Avaliação de organismos antagônicos a *Penicillium expansum* em maçãs cv. Fuji em pós-colheita. **Fitopatologia Brasileira**, v. 17, n. 4, p. 423-429, 1992.